**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ISABEL CRISTINA MENEGHETTI

**Efeito terapêutico do chá verde na morfologia
das glândulas submandibulares de ratos com
diabetes induzido pela estreptozotocina**

**BAURU
2010**

ISABEL CRISTINA MENEGHETTI

**Efeito terapêutico do chá verde na morfologia das glândulas
submandibulares de ratos com diabetes induzido pela
estreptozotocina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia e Biologia Oral (opção Biologia Oral)
Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

BAURU

2010

Meneghetti, Isabel Cristina

M525e Efeito terapêutico do chá verde na morfologia das glândulas submandibulares de ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina / Isabel Cristina Meneghetti. - Bauru, 2010.
157p. ; il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 10/2007
Data: 19/06/2007

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, AQUELE a quem sempre confiei e nunca me faltou. Aquele que me proporcionou a vida, saúde e condições para que eu chegasse até aqui e pudesse fazer o meu trabalho.*

*Aos meus pais, **Carlos e Fátima**, pela educação, carinho, dedicação e compreensão. Aos meus queridos irmãos **Naila, Antonio Carlos e Ana Beatriz** por todos os bons momentos compartilhados; e meus avós **Antonio e Guisley**.*

*Ao meu futuro marido, **Nelson**, por sua paciência, carinho, apoio e incentivo nos momentos difíceis.*

*As minhas queridas amigas **Marina Gabriela Berchiol e Valéria Romero da Motta** que sempre apoiaram e ajudaram nas minhas decisões, e a cada dia tornar-me uma pessoa melhor.*

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Gerson Francisco de Assis**, meu orientador, pela confiança, ensinamento, competência e paciência prestadas durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Histologia (FOB/USP), **Rumio Taga, Gustavo Pompermaier Garlet e Dagoberto Sottovia Filho**, pelos conhecimentos transmitidos e pelo incentivo à pesquisa.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru e em especial as técnicas do Laboratório de Histologia, **Tânia, Danielle e Patrícia**, pelo apoio e auxílio prestados no desenvolvimento da pesquisa e elaboração desta dissertação.

A aluna de Iniciação Científica, do Laboratório de Histologia **Tamirris Vallim Z. de Oliveira**, pela amizade e auxílio na realização dessa dissertação.

Aos amigos de Pós-Graduação do Laboratório de Histologia, **Carlos Eduardo, Ricardo, Marcela, Gabriela, Elcia e Bruna**, pelo companheirismo e apoio.

As minhas amigas de graduação e pós-graduação **Aline de Lima Leite e Mileni Fernandes** com quem sempre pude contar, nos momentos fáceis e difíceis; com quem pude desabafar; que me deram conselhos; que me ajudaram, e ajudam a cada dia tornar-me uma pessoa melhor.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Efeito terapêutico do chá verde na morfologia das glândulas submandibulares de ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina

A *Camellia sinensis*, vem sendo amplamente estudada, em função das suas propriedades medicinais, devido aos polifenóis com funções antioxidantes, tendo seu uso proposto como terapêutica para algumas doenças metabólicas como o *Diabetes mellitus*. A ingestão diária de antioxidantes, principalmente com compostos fenólicos pode retardar o aparecimento destas doenças. O atual trabalho avaliou possível efeito terapêutico do chá verde (*Camellia Sinensis*) em ratos diabéticos induzido pela estreptozotocina, parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica) e laboratoriais (glicemia de jejum, colesterol total, triglicérides, proteínas totais, albumina e uréia) esse efeito na glândula submandibular pelo método morfométrico. Cento e sessenta ratos machos com 2 meses de idade foram distribuídos inicialmente em controle (n = 80) e diabéticos (n = 80). Os animais do grupo controle água (CA) e diabético água (DA) consumiram água como dieta líquida e os animais dos grupos controle chá (CC) e diabético chá (DC) receberam apenas dieta líquida de chá verde. Os parâmetros bioquímicos e morfométricos foram avaliados nos períodos experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias (n = 5), após a indução. Os resultados mostraram que: a) a ingestão hídrica dos animais dos grupos DA e DC foram em média 6 vezes maior em relação aos controles; b) aos 15 dias, todos os animais dos grupos CA, CC e DA apresentaram aumento nos índices glicêmicos final de, respectivamente, 45 mg/dL, 65 mg/dL e 88mg/dL em relação ao período inicial, enquanto que todos os animais do grupo DC tiveram seus índices glicêmicos reduzidos em média de 119 mg/dL; c) nos ratos diabéticos o perfil bioquímico das proteínas totais e albumina foram menores em relação aos controles e o da uréia maior, enquanto que, o colesterol total, triglicérides não apresentaram diferenças; d) os ácinos das glândulas submandibulares dos animais dos grupos DA e DC exibiram aumento da eosinofilia citoplasmática e ausência da basofilia basal, indicativos de alteração no conteúdo protéico e na síntese protéica, além de núcleos picnóticos, indicativos de morte celular por apoptose. Morfometricamente, o volume individual das células acinosas aumentou, enquanto que, o número total de células diminuiu, mantendo o volume total dos ácinos constante durante todo período experimental; e) os ductos granulosos, no grupo CA apresentaram aumento de 125% no seu volume total entre 15 e 90 dias, decorrente do desenvolvimento desta estrutura, aumentando o número e o volume celular. Já, nos DA e DC, o número e o volume individual das células mantiveram-se constante durante todo período experimental. Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a glândula submandibular é um órgão afetado pelo diabetes e a terapêutica utilizada neste experimento (*Camellia sinensis*) não foi efetiva para o tratamento do diabetes crônica.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Glândula submandibular. *Camellia sinensis*.

ABSTRACT**Therapeutic effect of green tea on the morphology of the submandibular glands streptozotocin-induced diabetic rats**

The *Camellia sinensis*, has been widely studied because of their medicinal properties due to the polyphenols with antioxidant functions, and proposed its use as treatment for various metabolic disorders such as diabetes mellitus. The daily intake of antioxidants, mainly phenolic compounds may prevent or delay onset of these diseases. In this study, the possible therapeutic action of green tea (*Camellia Sinensis*) in diabetic rat induced chemically by streptozotocin was evaluated by clinical (weight, water intake) and laboratory parameters (fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, total protein, albumin and urea) and its effect in the submandibular glands by morphometric methods. One hundred and sixty male rats with 2 months of age were distributed initially in control (n = 80) and diabetic (n = 80). The animals of the water control (WC) and water diabetic (WD) groups received only regular drinking water and green tea control (GTC) and green tea diabetic (GTD) groups received green tea solution *ad libitum*. Morphometric and biochemical parameters were evaluated after 15, 30, 60 and 90 days (n = 5) after induction. The results showed that: a) the water intake of animals from group WD and GTD were six times higher on average than control groups; b) at 15 days, all animals of the WC, WD and GTC groups showed an increase of the glycemic index of, respectively, 45 mg/dL, 65 mg/dL and 88 mg/dL compared to the initial period, while that all animals in CTD group, showed a decrease of 119mg/dL; c) in the diabetic rats of WD and GTD groups the total protein and albumin levels were lower than control groups and urea level higher, whereas, the total cholesterol and triglyceride did not show significant differences, d) the acini of submandibular glands of animals in groups WD and GTD showed increase of the cytoplasmic eosinophilia and absence of the basal basophilia, which may be indicative of changes in protein content and/or structure, and pyknotic nuclei indicative of cell death. Morphometrically, the volume of acinar cells increased, whereas the cell number decreased, maintaining the total volume of acini constant throughout the experimental period, e) the granular convoluted tubules in development showed an increase of 125% between 15 and 90 days in the WC group, due to increase in the number and volume of its cells. In DA and DC groups, the number and volume of cells remained constant throughout the experimental period. Based on the results, we infer that the submandibular gland is an organ affected by diabetes and that the green tea (*Camellia sinensis*) therapy used in this experiment is not effective for the treatment of chronic diabetes.

Keywords: Diabetes mellitus. Submandibular gland. *Camellia sinensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Grupo experimental Controle Água
CC	Grupo experimental Controle Chá
DA	Grupo experimental Diabético Água
DC	Grupo experimental Diabético Chá
Vvi	Densidade de Volume
Vti	Volume Total de cada estrutura estudada
Pi	Ponto sobre ácino da glândula
Pn	Ponto sobre núcleo das células acinosas
Pcit	Ponto sobre citoplasma das células acinosas
pnac	Densidade de volume nuclear
Vnac	Volume nuclear das células acinosas
Vcitac	Volume citoplasmático das células acinosas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	DIABETES MELLITUS	19
2.2	ESTUDOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO A DIABETES.....	21
2.2.1	Drogas	21
2.2.2	Intervenção cirúrgica	22
2.2.3	Dietas.....	22
2.2.4	Métodos misto	23
2.3	GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES – SUBMANDIBULAR.....	23
2.4	CHÁ VERDE.....	26
3	PROPOSIÇÃO	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.2	INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	35
4.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL	37
4.3.1	Metodologia empregada na Coleta de Dados	37
4.3.2	Dosagens laboratoriais.....	38
4.4	DIETA E TRATAMENTO TERAPÊUTICO	38
4.5	MORTE DOS ANIMAIS, COLETA E PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICO DAS GLÂNDULAS	39
4.5.1	Morte dos animais	39
4.5.2	Coleta das glândulas.....	39
4.5.3	Procedimentos histotécnicos.....	39
4.6	ANÁLISE HISTOLOGICA DAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES	40
4.7	DETERMINAÇÃO DO VOLUME PROCESSADO	40
4.8	DETERMINAÇÕES MORFOMÉTRICA.....	41
4.8.1	Casualização dos campos microscópicos.....	41
4.8.2	Avaliação da densidade volume (Vvi) e volume total (Vti), das estruturas glândulares e da densidade de volume nuclear (pnac) da célula acinosa e dos ductos granulosos	42

4.8.3	Avaliação do volume nuclear (Vnac) e do citoplasma (Vcitac) das células acinosas e ductos granulosos	43
4.8.4	Avaliação número de células acinosas e dos ductos granulosos pelo método II de AHERNE	44
4.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	44
5	RESULTADOS	47
5.1	MASSA CORPORAL E OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	49
5.2	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	51
5.3	DADOS DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR	60
5.3.1	Dados morfológicos da glândula submandibular	61
5.3.1.1	Período de 15 dias	61
5.3.1.2	Período de 30 dias	67
5.3.1.3	Período de 60 dias	73
5.3.1.4	Período de 90 dias	79
5.3.2	Dados morfométricos da glândula submandibular	85
5.3.2.1	Densidade Volume	85
5.3.2.2	Volume Total	91
5.3.2.3	Número de Células	97
5.3.2.4	Volume Celular	99
5.3.2.5	Volume Citoplasmático	101
5.3.2.6	Volume Nuclear	103
6	DISCUSSÃO	105
6.1	O MODELO EXPERIMENTAL	107
6.2	O USO DO CHÁ PARA O CONTROLE DA GLICEMIA	108
6.3	ALTERAÇÕES CLÍNICAS E NAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS QUANTO AO DIABETES E SUA TERAPÊUTICA COM O CHÁ VERDE ...	111
6.4	AS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES E A MANUTENÇÃO DA SAÚDE BUCAL	113
6.5	ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES QUANTO AO DIABETES	114
6.6	TERAPÊUTICA DO CHÁ VERDE E AS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES EM DIABÉTICOS	118
6.7	APLICAÇÕES FUTURAS	118

7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS.....	125
	APÊNDICES.....	141
	ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma síndrome de comprometimento do metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas, causada pela ausência de secreção de insulina ou por redução da sensibilidade dos tecidos à insulina (GUYTON, 2002). A hiperglicemia crônica do diabetes está associada às alterações estruturais, às disfunções e à falência de vários órgãos, ou glândulas, como as salivares (NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1985; MEALEY, 1998; REPORT, 2002; NATHAN, 2002).

A indução do diabetes poder ser realizada por diversos mecanismos, tais como, indução por estresse, infecções, hormônios anti-insulínicos e manipulação como a pancreatômia (MORDES e ROSSINI, 1985). Esta indução também pode ser realizada experimentalmente também por meio de drogas diabetogênicas como aloxana e estreptozotocina (SPADELLA et al., 2005; LERCO et al., 2003).

A correlação entre a doença diabetes e a glândula salivar tem sido objeto de estudo principalmente experimental, onde foi observado atrofia glandular, degeneração de nervos, morte das células acinares com posterior substituição por tecido conjuntivo, perda do volume secretório e as alterações na cinética de secreção, entre outras (CUTLER et al., 1979; HIGH, SUTTON, HOPPER, 1985; ANDERSON e GARRETT, 1986, 1994; REUTERVING et al., 1986, 1987; JOHNSON et al., 1987; MORRIS et al., 1992; ANDERSON et al., 1993). Portanto esta correlação já está bem documentada na literatura, por isso optou-se por estudar a provável ação terapêutica de um chá (*Camellia sinensis*), com atividade hipoglicemiante e possível interferência na morfologia da glândula submandibular.

Segundo Yung-Hsi (2000), o chá verde e preto diminui o nível glicêmico de animais diabéticos, demonstrando uma interação entre seus princípios ativos e o metabolismo da glicose. Também ocasiona a diminuição do processo inflamatório que leva a alterações vasculares (CRESPY e WILLIAMSON, 2004). Schmitz (2005), verificou uma diminuição da peroxidação de lipídio no fígado, no soro e em tecido nervoso de animais submetidos a uma dieta líquida de chá verde durante cinco semanas. Minimizou alterações neurológicas e hepáticas (CRESPY e WILLIAMSON,

2004; VINSON e ZHANG, 2005), inibiu o aparecimento de catarata (VINSON e ZHANG, 2005), entre outros benefícios (YUNG-HSI et al., 2006).

Deste modo, no presente estudo, propôs-se avaliar o possível efeito do chá verde (*Camellia sinensis*) na preservação da morfologia da glândula submandibular de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

Os primeiros relatos da doença estão escritos desde o ano de 1500 a.C., no Egito antigo (NOTKING, 1979). No século XIX, a causa do diabetes foi identificada por dois pesquisadores austríacos. Oscar Minkowski e Baron Joseph Von Mering (1989) identificaram no pâncreas a causa do diabetes, após a remoção deste órgão em cães normais, estes apresentaram os sintomas da doença. Portanto, a partir desta data, iniciou-se os estudos do diabetes (NOGUEIRA, 2004).

Em 1921, Frederick Banting e Charles Best, observaram através do extrato de pâncreas, injetado em cães diabéticos, que alguma ou algumas substâncias deste órgão seriam as responsáveis pelo controle ou prevenção do diabetes, já que a mesma reduziu a glicemia dos animais. Dessa forma, foi possível o início do tratamento da doença.

O diabetes é uma doença metabólica sistêmica crônica, decorrente da deficiência total ou parcial na síntese da insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. É caracterizada pela alteração no metabolismo de proteínas, lipídeos, sais minerais e principalmente de glicose (DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2000). Essa doença possui uma série de sintomas comuns, tais como sede e fome excessiva, fraqueza muscular, perda de peso e elevação do nível de glicose no sangue, resultando na excreção dela pela urina (NEGRI, 2005).

O Diabetes pode ser classificado atualmente em: diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; diabetes gestacional e outros tipos específicos (DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2000; GUYTON, 2002; MEALEY e OATES, 2004; SINGH et al., 2004).

Diabetes tipo 1, também denominado *diabete mellito insulino-dependente (DMID)*, é uma doença geneticamente influenciada, imunologicamente mediada, com fase assintomática, seguida de manifestações de insulinopenia (MUIR et al., 1992), causada pela falta de secreção de insulina. O tipo 1 pode desenvolver-se de

maneira muito abrupta, no decorrer de períodos de apenas alguns dias ou semanas, com três alterações principais: aumento do nível de glicemia, utilização de gorduras para obtenção de energia e para a formação de colesterol pelo fígado e depleção das proteínas do organismo (GUYTON, 2002).

O diabetes tipo 2, também é denominado *diabete mellito não-insulino-dependente (DMNID)*. Compreende um conjunto de alterações metabólicas, caracterizadas principalmente por hiperglicemia resultante de defeitos da síntese e secreção insulínica e/ou sua ação nos tecidos (DIABETES CARE, 1997). Tem por causa a redução da sensibilidade dos tecidos alvos ao efeito metabólico da insulina (GUYTON, 2002). A maioria dos pacientes com essa doença são obesos e sedentários. Entre os casos clínicos de diabetes mellitus, 90% são do tipo 2 (GROSS, 2002).

A diabetes gestacional é definida como qualquer grau de intolerância à glicose, com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (CALDERON et al., 2007). Na gestação ocorre uma adaptação hormonal, representada por aumento dos níveis de estrógenos, progesterona, cortisol, prolactina e a produção de lactogênioplacentário humano. Essas mudanças interferem no equilíbrio metabólico podendo resultar, em mulheres susceptíveis, o desencadeamento da doença e naquelas previamente diabéticas em uma piora do controle glicêmico (MONTENEGRO et al., 2001). Mulheres com predisposição de desenvolver o diabetes gestacional têm a seguinte característica: idade superior a 25 anos, obesidade pré-gestacional ou ganho excessivo de peso durante a gravidez, histórico familiar de diabetes, histórico pessoal de resultado obstétrico adverso, tolerância anormal da glicose, e membros de um grupo étnico com uma alta prevalência de diabetes (CALDERON et al., 2007).

Há outros tipos de diabetes, que ocorrem devido a defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos da ação da insulina, endocrinopatias, diabetes induzido por drogas e agentes químicos, infecções e enfermidades no pâncreas (COMITTEE ON RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY, 2000; DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2000; MEALEY e OATES, 2006).

O efeito básico da ausência de insulina ou da resistência ao hormônio sobre o metabolismo da glicose consiste, em impedir sua captação e utilização eficiente pela

maioria das células do corpo, exceto as células do cérebro. Como consequência, o nível da glicemia aumenta, a utilização da glicose pelas células fica cada vez menor, enquanto a utilização das gorduras e das proteínas aumentam (GUYTON, 2002).

Esse efeito, em longo prazo, leva ao desenvolvimento de cardiopatias, neuropatia, retinopatia, nefropatia, entre outras complicações (VERNILLO, 2001; STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES, 2005).

2.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO A DIABETES

2.2.1 Drogas

As drogas utilizadas para a indução do diabetes são amplamente empregadas, sendo um dos modelos mais agravantes. A substância exógena administrada ao animal promove alterações diretas no metabolismo basal, levando aos sintomas do diabetes. As drogas mais utilizadas para a indução do diabetes são estreptozotocina, aloxana e glutamato de monossódico (SILVA, 2007).

A estreptozotocina é um glicosídeo nitroso natural isolado do *Streptomyces achromogenes*, a qual estimula a produção de radicais livres, levando a destruição e disjunção das células beta da ilhota de Langerhans (MARLES e FARNSWORTH, 1995). Para indução do diabetes tipo 2, a droga pode ser administrada em dose única, em neonatos, por via intravenosa ou intraperitoneal. A dosagem pode variar de 30 a 200 mg/Kg, sendo que os animais submetidos a esse tipo de indução adquirem diabetes na fase adulta (CARDENAS, 2005). Para a indução do diabetes tipo 1, a administração da droga ocorre em dose única, em animais adultos, por via de administração caudal, ou via intraperitoneal. A dose a ser administrada pode apresentar variações de 40 a 80 mg/Kg. Entre as dosagens mais utilizadas estão 60 e 65 mg/Kg (JUNOD et al., 1969; HAND E WEISS, 1984; ANDERSON e GARRET, 1986; KAKKAR et al., 1995; KAMTCHOUING et al., 1998; MAHAY et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2004; GHATHI et al., 2004; NOGUEIRA, 2004; NICOLAU et al., 2005; CARDENAS, 2005; FERNANDES et al., 2009).

O aloxano é um derivado da pirimidina, tóxico e seletivo das células beta pancreáticas, por causar a inibição da glicoquinase. Pode ser utilizada na indução dos dois tipos de diabetes (MARLES e FARNSWORTH, 1995). Os animais submetidos ao tratamento com aloxano adquirem níveis glicêmicos característicos, incluindo uma breve hiperglicemia, seguida de hipoglicemia transitória e finalmente, a hiperglicemia crônica. A indução é irreversível, sendo laboratorialmente comprovada após aproximadamente sete dias. (OZUARI et al., 1993; ALTAN et al., 1994; LERCO et al., 2003; CARVALHO, CARVALHO e FERREIRA, 2003).

O glutamato monossódico é um composto utilizado na culinária, encontrado em conservantes e temperos. A aplicação dessa droga em neonatos ocasiona lesão hipotalâmica. Na idade adulta, os animais apresentam diabetes tipo 2 (IWASE et al., 1998).

2.2.2 Intervenção cirúrgica

Alguns métodos cirúrgicos podem levar o animal ao diabetes. Esses métodos visam alterar funções básicas de um tecido ou órgão específico, essa alteração poderá levar outros sistemas do organismo ao desenvolvimento do diabetes, sendo este método direto da indução (CARDENAS, 2005). Um dos métodos utilizados é o retardo da irrigação sanguínea em um tecido ou órgão, observados no término da prenhez nas ligações das artérias intrauterinas em ratas, causando deficiência nutricional ao feto, e na idade adulta, esses mesmos animais apresentam sintomas similares ao diabetes (SIMMONS et al., 2001).

2.2.3 Dietas

Em 1990, surgiram vários trabalhos utilizando diferentes tipos de dietas para animais. Essas dietas evidenciam taxas aumentadas de lipídeos e/ou carboidratos, com o objetivo de alterar o comportamento alimentar, causando alterações metabólicas severas, as quais poderiam levar a resistência à insulina e/ou diabetes

(PEREZ et al., 2001). Dois tipos de dietas são empregadas, uma delas consiste em oferecer ração suplementada com frutose, a qual a longo prazo (sete meses de vida) os animais apresentam hiperinsulinemia, resistência a insulina e diabetes (CHAJARA et al., 2000). A segunda é a dieta “*lanchonete*”, na qual os animais recebem alimentos hipercalóricos, como chocolate, manteiga e amendoim, durante vários meses, desenvolvendo uma possível hiperglicemia, obesidade, resistência a insulina e diabetes (PETRY et al., 2000).

2.2.4 Métodos misto

Observa-se também a indução do diabetes com dois ou mais modelos experimentais, por exemplo, ratos da linhagem OLETF tratados com a dieta hipercalórica (OKAUCHI et al., 1995), animais da linhagem ZUCKER tratados com estreptozotocina (TURNER et al., 1996), camundongos C57BL/6J, submetidos a estreptozotocina e alimentos ricos em frutose ou lipídeos (LUO et al., 1998), e camundongos da linhagem C57BL/6J tratados com dieta hipercalórica (LEE et al., 1995).

2.3 GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES – SUBMANDIBULAR

As glândulas salivares, ou órgãos equivalentes, estão presentes em diversos vertebrados, bem como em várias classes de invertebrados, sendo melhor desenvolvidas em pássaros, répteis e mamíferos. Uma grande diversidade de espécies animais depende da saliva para sobreviver, como ocorre, por exemplo, com alguns répteis, os quais a utilizam para excretar seu veneno e incapacitar a presa; com os ruminantes, que dependem desta secreção para realizar a digestão; ou ainda, com alguns animais, como o tatu e o tamanduá, os quais se valem da mucina salivar para capturar e reter suas presas (MANDEL, 1987).

Em humanos a glândula submandibular está situada na parte posterior do assoalho da boca, próxima a posição medial da mandíbula e envolvida pela borda

posterior do músculo milo-hióide (TEN CATE, 2008). É uma glândula tubuloacínosa composta, sua porção secretora é constituída por células mucosas e serosas, ductos intercalares, estriados e excretores (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Em roedores, ratos e camundongos, a submandibular localiza-se bilateralmente na região cervico-ventral, ao lado da traqueia, logo abaixo do tegumento. O parênquima glandular do rato ou camundongo adulto é formado pelos seguintes compartimentos: ácinos (seroso e mucoso), ducto intercalar, granuloso, estriado e excretor (ASSIS, 1991).

A peculiaridade do ducto granuloso da glândula submandibular de ratos e camundongos é bastante estudada, pois há neste segmento do adenômero uma substância protéica capaz de induzir o crescimento e diferenciação de neurônios do sistema simpático em inúmeros vertebrados, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de células mesenquimais, fator de crescimento mesodérmico, eritropoietina, renina, e as enzimas amilase, protease e fosfatase ácida (JUNQUEIRA, 1949; LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960; COHEN, 1962; ATTARDI, 1967; WEIMAR e HARAGUCHI, 1975; FAVA DE MORAES et al., 1979; TANAKA, 1981; DOINE, 1987).

A cavidade oral é mantida úmida pela saliva, a qual cobre o dente e mucosa. A saliva é um fluido complexo, produzida pelas glândulas salivares, cuja função mais importante é a manutenção e bem estar da boca (TEN CATE, 2008). Acima de 1,5 litros do fluido de saliva, são produzidos a cada 24 horas por um adulto humano saudável, tendo como função não somente lubrificar a boca e a laringe superior, mas, também, colaborar com a fala, a mastigação, a deglutição e a gustação (FOX, 1985; ATKINSON, WU, 1994; CHÁVEZ et al., 2000, 2001; TEN CATE, 2008). Outras funções importantes são atribuídas ao fluido salivar, salientando-se, a digestão inicial dos alimentos, a aceleração do processo cicatricial e a modulação da microbiota bucal (MANDEL, 1987; MANDEL, 1989; FERGUSON, 1995).

As disfunções das glândulas salivares, no homem, não comprometem plenamente a sobrevivência da espécie, porém colaboram para uma redução na qualidade de vida (CHÁVEZ et al., 2000, 2001; NEDERFORS, 2000).

A xerostomia, ou “boca seca”, é outra queixa freqüente em indivíduos com alterações funcionais das glândulas salivares (ATKINSON, WU, 1994). O sintoma de secura bucal é relevante na clínica médica, principalmente, por estar associado com

um grande número de doenças sistêmicas (CHÁVEZ et al., 2000, 2001). Uma diversidade de moléstias, como a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico, o escleroderma, a síndrome de Sjögren, a doença de Alzheimer e o *Diabetes Mellitus*, têm sido correlacionadas com as disfunções das glândulas salivares (NEDERFORS, 2000).

Na odontologia, as pesquisas com diabetes iniciou-se no século passado, quando Liu e Lin verificaram um retardo no desenvolvimento corporal e glandular (parótida e submandibular) em ratos diabéticos; os animais em desenvolvimento tratados com a insulina, durante o experimento, não apresentaram o retardo. Pesquisa com animais adultos apresentaram uma redução dos pesos glandulares e dos diâmetros dos ductos da glândula submandibular (LIU e LIN, 1969; NOGUEIRA, 2004).

As principais complicações bucais associadas ao diabetes incluem a xerostomia, a candidíase, a gengivite, a doença periodontal, os abscessos periapicais, a síndrome da ardência bucal, um aumento na incidência e na severidade das cáries dentárias e uma falha no processo de cicatrização (THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999; VERNILLO, 2001).

Outros pesquisadores, como, Cutler et al. (1979), High, Sutton, Hopper (1985), Anderson e Garrett (1986, 1994), Reuterving et al. (1986, 1987), Johnson et al. (1987), Morris et al. (1992), Anderson et al. (1993), observaram mudanças das glândulas salivares, em modelos experimentais do diabetes induzido quimicamente pela aloxana ou estreptozotocina, como: atrofia das glândulas salivares, degeneração dos nervos autonômicos, morte das células acinares, com posterior substituição por tecido conjuntivo, perda do volume secretório. Essas alterações parecem estar correlacionadas com as manifestações bucais em pacientes diabéticos.

Outros estudos do diabetes experimental demonstraram redução do crescimento e maturação glandular, alteração no conteúdo e síntese protéica, e mudança no metabolismo de carboidratos (HAND e WEISS, 1984).

Na glândula parótida, de ratos induzidos por aloxana ou estreptozotocina, houve uma redução na atividade da enzima amilase na glândula e saliva, no entanto, quando esses animais foram tratados com insulina, a atividade da enzima

retornou a valores normais (ANDERSON, JOHNSON, 1981; ANDERSON, 1983; KIM et al., 1990; ANDERSON, BEVAN, 1992; SZCZEPANSKI, MEDNIEKS, HAND, 1998).

Ferreira et al., 2005, verificou uma redução na massa fresca da glândula submandibular, no volume total dos ácinos e dos ductos granulosos nos ratos diabéticos, em relação ao não diabético. High, Sutton, Hopper (1985) obtiveram nos ratos diabéticos, após 3 meses da indução, uma massa glandular 57% menor e os volumes dos ácinos e ductos granulosos, respectivamente, 30% e 47% menores em relação aos não diabéticos. Noorafshan (2006) obteve uma redução de 25% dos ácinos serosos da glândula submandibular de ratos diabéticos de 3 meses de indução.

Foi observado em ratos diabéticos, vacuolizações nos ácinos das glândulas submandibulares (FERREIRA et al., 2005). Essas vacuolizações são inclusões lipídicas observadas também em outros trabalhos com glândulas salivares (ANDERSON, GARRET, 1986; REUTERVING et al., 1987; MORRIS et al., 1992; MAHAY et al., 2004).

2.4 CHÁ VERDE

A *Camellia sinensis*, é uma planta perene tipo arbustiva, pertencente a Família das Theacea, Gênero *Camellia* e espécie *sinensis* (SCHMITZ et al., 2005). Originária do sudeste asiático, suas flores são pequenas, brancas, geralmente com 4 ou 5 pétalas. O fruto é uma cápsula com 2 ou 3 cm de diâmetro. No Brasil o arbusto é cultivado principalmente na região do vale do Ribeira, estado de São Paulo, onde é utilizada para fazer chá (BLANCO, 2007).

A partir da obtenção e tratamento das folhas da *Camellia sinensi*, é possível obter diferentes tipos de chá, como o chá verde, preto e oolong. O chá verde pode ser obtido por folhas novas e tenras (MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

O chá, indiferente da sua composição, é a bebida mais popular consumida pelo mundo. O consumo concentrava-se na região da Ásia e Europa, o qual vem mudando nos últimos anos, devido aos estudos que demonstram seus valores

benéficos. Observa-se que é mais vantajoso o estudo e obtenção de resultados satisfatórios utilizando-se plantas do uso popular, como o chá verde (MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Estudos demonstraram que o chá verde possui componentes biologicamente ativos, como: polifenóis, em especial as catequinas (ECG) e as epigalocatequinas (EGCG), flavonóides, vitaminas, alcalóides e sais minerais (TREVISANATO, 2000; SABU, SMIHTA, KUTTAN, 2002; YOKOZAWA, NAKAGAWA, KITANI, 2002; SKRZYDLEWSKA et al., 2002). Devido essas propriedades, muitas indústrias farmacêuticas extraem, produzem e comercializam seus ativos.

Os polifenóis, presentes na *Camellia sinensis*, apresentam atividades biológicas importantes em certas patologias como: diabetes mellitus, cardiopatias, infecções virais, inflamações e em doenças degenerativas, como o câncer e o envelhecimento (SCHMITZ et al., 2005). Evidências sugerem que a ingestão diária de antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, é capaz de retardar o aparecimento destas doenças (MANFREDINI, MARTINS, BENFATO, 2004). Estudos *in vitro* com a catequina relataram proteção contra doenças degenerativas. Experimentos com ratos diabéticos, tratados com chá verde apresentaram uma diminuição no nível glicêmico, demonstrando uma interação entre a catequina e o metabolismo da glicose (CRESPY e WILLIAMSON, 2004; WU, et al., 2004). Sabu et al., 2002, observou o efeito da fração do polifenol do chá verde na redução do estresse oxidativo em ratos diabéticos induzido pela aloxana.

Outras propriedades biológicas foram identificadas. Schmitz, 2005, verificou uma diminuição da peroxidação de lipídio no fígado, no soro e em tecido nervoso de animais submetidos a uma dieta líquida de chá verde durante cinco semanas. Em ratos diabéticos os produtos do chá verdes ou pretos reduziram a glicemia (YUNG-HSI, 2000) e diminuiu o processo inflamatório que leva a alterações vasculares (CRESPY, WILLIAMSON, 2004), minimizou alterações neurológicas e hepáticas (CRESPY, WILLIAMSON, 2004; VINSON, ZHANG, 2005), inibiu o aparecimento de catarata (VINSON, ZHANG, 2005), entre outros benefícios (YUNG-HSI et al., 2006).

Outras plantas medicinais estão sendo utilizadas no tratamento do diabetes. Verifica-se o relato de 725 gêneros em 183 famílias, a maioria destas plantas são utilizadas como antidiabéticas, após serem avaliadas farmacologicamente. Podem demonstrar atividades hipoglicemiantes por possuírem constituintes químicos que

podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes, como exemplo, *Arctium minus*, *Anacardium occidentale*, *Cecropia hololeuca*, *Momorcadica charantia*, *Eugenia jambolana*, *Mucuna pruriens* e *Tinospora cordifoli* (BAILEY e DAY, 1989; NEGRI, 2005; AGRA et al., 2007).

O mecanismo de ação da *Camellia sinensis* sobre o diabetes, até o presente estudo, não encontra-se elucidado. O mecanismo de ação geral pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores, aumento da liberação de insulina através da estimulação das células beta-prancreáticas, resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose, aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, diminuição da perda de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, eliminação de radicais livres, resistência a peroxidação de lipídeos, correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulos ao aumento do microcirculação do sangue no organismo (MARLES, FARNSWORTH, 1995; SAID et al., 2002; LI et al., 2004; VOLPATO et al., 2002; HUO et al., 2003).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito terapêutico do chá verde (*Camelia sinensis*), na glândula submandibular de ratos diabéticos, nos períodos experimentais 15, 30, 60 e 90 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- ❖ aspectos clínicos, bioquímicos do sangue e glicemia;
- ❖ massa corporal e massa glandular da glândula submandibular;
- ❖ morfologia subjetiva das glândulas submandibulares ao microscópio de luz;
- ❖ morfometria das glândulas submandibulares ao microscópio de luz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) machos, com dois meses de idade e massa corporal ao redor de 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP). Conforme o esquema ilustrado na Figura 1, 40 ratos foram aleatoriamente destinados ao grupo controle e 60 ratos ao grupo diabético. O maior número de animais no grupo diabético foi devido à expectativa de perda dos animais decorrente de morte pela toxicidade da droga e da não indução do diabetes referente à resistência do animal à dosagem administrada (DELFINO et al., 2002; LERCO et al., 2003). Após a comprovação clínica e laboratorial do estado glicêmico no 7º dia de segmento, os animais foram subdivididos em 4 subgrupos com 5 animais cada: Controle Água (CA), Controle Chá (CC), Diabético Água (DA) e Diabético Chá (DC). Os animais de cada subgrupo foram divididos conforme o período experimental de 15, 30, 60 e 90 dias (n=5 ratos).

Todo procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 010/2007) em 19 de junho de 2007 (Anexo A).

4.2 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Os animais do grupo diabético foram submetidos a jejum prévio de 12 horas para dieta sólida e, em seguida, foram pesados e numerados. O diabetes foi induzido quimicamente através da aplicação intraperitoneal de uma única dose de 50 mg/Kg de estreptozotocina¹ (NOORAFSHAN, 2006) dissolvida em soro fisiológico na proporção de 20mg/mL. Após 30 minutos, os animais receberam alimento sólido

¹ Estreptozotocina de anomeros mistos S0130 (Sigma Aldrich®, China CSA n° 18883.66-4)

e líquido normalmente, sendo mantidos no biotério com acompanhamento diário da evolução do quadro clínico. No 7º dia, somente os animais que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diabetes foram selecionados para o grupo diabético. As alterações clínicas compreenderam em perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 200 mg/dl, glicosúria maior ou igual a 3000 mg/dl e positiva (+++) no teste de fitas reagentes (Pharmaceutical Corp. YEONDONG-Seoul Korea) (Figura 1).

Figura 1 - Delineamento experimental e indução do diabetes

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

Os dados clínicos de todos os grupos, incluindo, peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, bem como os dados laboratoriais referentes à dosagem de glicemia de todos os animais foram realizados, inicialmente, com 7 dias de seguimento nos grupos controles, e no 7^o dia após a indução do diabetes nos grupos diabéticos. Posteriormente, as avaliações foram realizadas ao término de cada período experimental imediatamente antes do sacrifício dos animais. Alguns desses dados serviram apenas para caracterizar o diabetes e não foi apresentada como resultado nesta dissertação.

4.3.1 Metodologia empregada na Coleta de Dados

Para a coleta dos dados clínicos e laboratoriais, cada animal foi submetido a um esquema padronizado de avaliação baseada no trabalho de Lerco et al., 2003. A metodologia utilizada foi realizada na seguinte sequência:

- a) Colocação dos animais em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas;
 - b) Fornecimento de volume conhecido de dieta líquida (água ou chá) durante todo o período de 24 horas;
 - c) Fornecimento de quantidade conhecida de ração durante o período diurno de 12 horas, após o qual foi retirada toda alimentação, por um período noturno de 12 horas (jejum de 12 horas);
 - d) Determinação, ao final do procedimento, do peso do animal em gramas, do volume de água e de chá ingerido em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas em ml), da quantidade de alimento ingerido em 12 horas (ingestão alimentar de 12 horas em gramas) e do volume de diurese de 24 horas (diurese de 24 horas em ml);
 - e) Ao término de cada período experimental, coleta de 7 mL de sangue obtida por punção cardíaca, sendo 1,5 mL destinado a dosagem glicêmica
-

e 5,5 mL para as demais dosagens bioquímicas. A glicemia sanguínea também foi determinada através do aparelho *ACCU-CHEK advantage*, Roche Diagnostic - 2004, Made in USA.

4.3.2 Dosagens laboratoriais

As dosagens bioquímicas (triglicérides, colesterol, uréia, albumina, proteínas totais e creatinina) foram obtidas sob a responsabilidade do farmacêutico-bioquímico Luiz Henrique Marchesano no aparelho automatizado LABMAX-240 da marca LABTEST do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais do Campus USP de Bauru (SP) utilizando Kits específicos para cada substância no plasma sanguíneo do rato.

4.4 DIETA E TRATAMENTO TERAPÊUTICO

Os animais dos grupos CA e DA foram mantidos até o período de sacrifício em gaiolas de poliuretano padronizadas, em grupos de 5 animais, com alimentação líquida (água potável) e sólida (ração em grãos para ratos da marca Purina) *ad libitum*, em ambiente climatizado de 12 horas de claro e 12 de escuro. Os animais dos grupos CC e DC receberam o mesmo tratamento sendo que a água foi substituída por uma infusão de chá verde (*Camellia sinensis* - proveniente da Essência Verde: Comércio de produtos naturais LTDA, ver Anexo B) contendo 7 gramas de folha seca por litro de água, aquecida até o ponto de fervura e deixado em infusão por 10 minutos. O chá foi trocado a cada 24 horas para evitar possível oxidação (MANFREDINI, 2004). Essa marca de chá foi escolhida por ter laudo técnico e controle de qualidade atestado por órgãos governamentais como o IBAMA e ANVISA e reconhecido pelo CRF (Conselho Regional de Farmácia) (Anexo B).

4.5 MORTE DOS ANIMAIS, COLETA E PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICO DAS GLÂNDULAS

4.5.1 Morte dos animais

Ao término de cada período experimental, foi administrado nos animais atropina (Soluto de atropina 1,25%, Laboratório Prado AS, Curitiba-Pr) na dosagem de 4,0mg/Kg de massa corporal. Após 5 minutos, os animais foram mortos (qual) através da administração de dose excessiva de anestésico (Cloridrato de Ketanina e Cloridrato de Xilazina da AgribRANDS do Brasil Ltda).

Todos os procedimentos histotécnicos foram realizados no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

4.5.2 Coleta das glândulas

Após a anestesia, foi determinada a massa corporal em uma balança Mettler Toledo PG5002-S[®], e a seguir, as glândulas submandibulares de cada animal foram cuidadosamente dissecadas e rapidamente removidas. A massa fresca da glândula foi obtida em uma balança analítica Mettler Toledo AT261 Delta Rang[®].

4.5.3 Procedimentos histotécnicos

Após a determinação da massa glandular, as glândulas submandibulares foram fixadas em solução de formalina a 10% com tampão fosfato, por 1 semana, à temperatura ambiente, lavadas em água corrente “over night” e processadas histologicamente por meio, da desidratação em soluções crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec (parafina + resina plástica) fundida na estufa a temperatura de 60° C.

Cortes semi-seriados de 6µm de espessura foram obtidos das glândulas em micrótomo Leitz-Jung®, com um intervalo de 50µm entre os cortes, e coradas pela Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1969).

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES

Os cortes teciduais de cada glândula submandibular foram avaliados morfolologicamente por uma descrição subjetiva e pela morfometria, utilizando um microscópio de luz marca Olympus Optical modelo BX50F4 e um retículo de integração Zeiss, descrito mais adiante.

4.7 DETERMINAÇÃO DO VOLUME PROCESSADO

Para a determinação de vários parâmetros morfométricos de natureza absoluta, como, o número total de células, o volume total de cada compartimento glandular, e outros, necessitamos conhecer o volume do órgão após todas as fases do processamento histológico.

O volume processado (Vp) pode ser estimado utilizando-se da massa fresca (m) da glândula submandibular, desde que conheçamos a densidade (d) do órgão e o percentual de retração provocado pelo processamento histológico (FR), pela seguinte relação:

$$Vp = \frac{m}{d} \cdot FR$$

Como para a determinação destes parâmetros seriam necessários mais um lote de animais eticamente optou-se por utilizar os valores de densidade e de fator de retração obtidos de projetos pilotos realizados em nosso departamento. Nos projetos pilotos tanto a densidade da glândula como o fator de retração não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre grupos nos

diferentes períodos experimentais, sendo utilizados os valores médios: $d = 1,06$ mg/mL e $Fr = 0,68$, para os cálculos.

4.8 DETERMINAÇÕES MORFOMÉTRICA

4.8.1 Casualização dos campos microscópicos

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos, estatísticos, derivados da probabilidade em que imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto central nestes métodos está na casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste, deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem. Isto se consegue pela aplicação de procedimento de casualização em todos os estágios do experimento, desde a escolha dos animais, a seleção dos blocos histológicos em cada lâmina e, principalmente, a seleção dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações.

De cada glândula foram obtidas 30 lâminas contendo seis (6) cortes semi-seriados cada uma. Por um sorteio foram escolhidas cinco (5) lâminas e de cada lâmina selecionado um (1) corte histológico.

Para a escolha dos 10 campos microscópicos por corte, foi utilizado um esquema de casualização sistemática segundo as indicações de Weibel, 1969. Salientando-se que nesse esquema os campos microscópicos são escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico foram representadas (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de casualização dos 10 campos microscópicos por corte histológico

4.8.2 Avaliação da densidade de volume (Vvi) e volume total (Vti), das estruturas glandulares e da densidade de volume nuclear (pnac) da célula acinosa e dos ductos granuloso

Esses parâmetros histológicos foram avaliados com uma objetiva de imersão de 100X e um graticulo de integração II Zeiss® colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e 100 pontos numa área quadrangular (Figura 3). A imagem do graticulo foi superposta sucessivamente a 50 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969), e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (Pi) que caíram sobre os ácinos e ductos granuloso (i) e sobre a glândula inteira (P); b) número de pontos que caíram sobre o núcleo (Pn) e sobre o citoplasma (Pcit) das células acinosas.

A partir destes dados, foram calculadas as seguintes dimensões morfométricas para os ácinos e os ductos granuloso: a) densidade de volume (Vvi), $Vvi = Pi/P$; b) volume total (Vti), a densidade de volume dos núcleos (pn), $pn = Pn/(Pn + Pcit)$ (WEIBEL, 1969).

Figura 3 - Graticulo de integração II Zeiss® sobre a imagem de um corte histológico

4.8.3 Avaliação do volume nuclear (V_{nac}) e do citoplasma (V_{citac}) das células acinosas e dos ductos granulosos

Os diâmetros ortogonais (D1 e D2) de 50 núcleos inteiros de ácinos e ductos granulosos de cada glândula, foram medidos com uma ocular micrométrica Olympus 10X, tipo Ramsden e objetiva de imersão em óleo 100X. Após o cálculo da média geométrica dos diâmetros por núcleo ($D = \sqrt{D1 \cdot D2}$), o raio médio (R) por animal foi calculado. De posse desse valor, o volume nuclear das células acinosas e dos ductos granulosos de cada glândula por animal foi calculado usando a fórmula:

$$V = 4/3\pi R^3$$

A densidade de volume de estruturas pequenas como os núcleos de cada estrutura (pn), obtidos como apresentado no item anterior (b) encontra-se sobreestimada devido ao efeito Holmes (WEIBEL, 1969). Esta sobre-estimativa foi corrigida usando o fator de correção (k_0): $k_0 = [1 - (3t/2)]$ (WEIBEL, 1969), onde: t = espessura do corte e D = média do diâmetro nuclear. Assim a densidade de volume

corrigida do núcleo (pncorr) e do citoplasma corrigido (pcitcorr.) é: $pncorr = pn/k_o$ e $pcitcorr. = 1 - pncorr$.

O volume citoplasmático (Vcit) foi calculado pela equação:

$$V_{cit} = V_n \times pcitcorr./pncorr$$

4.8.4 Avaliação número de células acinosas e dos ductos granulosos pelo método II de AHERNE

A avaliação do número de cada categoria celular pelo método II de AHERNE (1982) foi realizada utilizando-se um retículo de integração II Zeiss colocado em uma ocular Kpl 8x Zeiss. Em 50 campos microscópicos casualizados por amostragem sistemática, contamos o número de imagens de transecções (fatias) de núcleos e núcleos inteiros (n) de cada categoria celular, assim como o número de intersecções que as bordas dos perfis das imagens das transecções e núcleos inteiros fazem com as linhas paralelas do sistema-teste. As contagens foram realizadas em um microscópio Olympus CH2 com objetiva de imersão 100x e os resultados obtidos foram apresentados em unidade de volume de tecido processado.

Conhecendo-se a área (A) total examinada, a distância (d) entre as linhas do sistema-teste, espessura ou thickness (t) do corte, o número de cruzamentos ou crosses (c) que as linhas do sistema-teste faziam com os núcleos, o número (n) de núcleos contados dentro da área examinada e o volume processado (Vp), calculamos o número de células pela relação:

$$N = 2n \times Vp / A(c/n \times d + 2t)$$

4.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Todos os dados laboratoriais bioquímicos, ponderais e morfométricos foram confrontados, entre os grupos, pela análise de variância (ANOVA) usando o software

SigmaStat – Jadel Scientific (Jadel Corporation[®]), para verificar se os mesmos diferem entre si dentro de um nível de significância 5%. Depois de obtido o valor médio das determinações, foi indicado o desvio padrão da média. Para melhor visualizar os dados foram apresentados em gráficos no corpo da dissertação e os valores em número mais significativos estão apresentados no Apêndice.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Observa tabelas dos dados em Apêndices.

5.1 MASSA CORPORAL E OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Salientamos que esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Histologia / Embriologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP).

A média e o desvio padrão da massa corporal e ingestão hídrica dos animais de cada grupo por período experimental esta apresentado nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Média e desvio padrão da massa corporal final (g) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

Figura 5 - Média e desvio padrão da ingestão hídrica (mL/24h) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As observações clínicas, análise das Figuras 4 e 5, bem como as análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Nos animais controles água (CA) e controles chá (CC), não houve alteração na massa corporal dentro do mesmo período durante todo o experimento, sendo sacrificados em bom estado geral (Figura 6-a). Os animais desses grupos mantiveram-se dentro dos níveis médios esperados para ratos saudáveis de mesma idade, exibindo massa corporal média de 335, 328, 371 e 415g, respectivamente, nos períodos experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias.
- Nos animais diabéticos água (DA) e chá (DC), ocorreram acentuadas alterações dos parâmetros clínicos compatíveis com diabetes grave, como progressiva queda do estado geral com perda inicial de massa corporal após a indução e ganho significativamente menor dessa massa em relação ao rato normal, alteração na pelagem, aumento da circunferência abdominal, devido ao intestino grosso distendido e palpável, e catarata (Figura 6-b). Como o observado no grupo controle, o consumo de chá verde também não interferiu na massa corporal no grupo diabético (DA versus DC), sendo as diferenças observadas somente com relação à presença ou

não do diabetes. Assim, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias, a massa corporal dos diabéticos foi em média 243, 187, 189 e 247g.

Com relação à ingestão hídrica não houve diferenças estatísticas entre os grupos controles (CA versus CC) e diabéticos (DA versus DC), porém nos animais dos grupos diabéticos (DA e DC) a ingestão hídrica foi em média 6,1 vezes maior em relação aos dos grupos controle (CA e CC).

Figura 6 - Aspectos físicos dos animais (ratos) dos grupos controle **(a)** e diabético **(b)**

5.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Salientamos que, os exames laboratoriais do sangue foram realizados no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofacial (HRAC) do Campus USP de Bauru (SP).

A média e o desvio padrão dos dados bioquímicos do sangue como as dosagens de glicose, uréia, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicérides e creatinina dos animais de cada grupo por período experimental estão apresentados nas Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Figura 7 - Média e Desvio Padrão da Glicemia Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

Figura 8 - Média da diferença entre a glicemia final (período experimental) e o inicial (7º dia de indução) em mg/dL dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias

A análise das Figuras 7 e 8, bem como as análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A glicemia de jejum (mg/dL) dos animais dos grupos CA e CC, em todos os períodos experimentais, não apresentaram diferença estatística, exibindo um valor médio de 136 mg/dL.
 - A glicemia de jejum (mg/dL) nos animais diabéticos foi em média 270% maior em relação aos do grupo controle, exceto nos ratos do grupo DC de 15 dias cujo valor foi de 195 mg/dL, não exibindo diferença estatisticamente significantes em relação aos controles.
 - Com relação à ingestão de chá verde, não houve diferença significativas nos índices glicêmicos tanto entre os grupos controles (CA versus CC) como entre os diabéticos (DA versus DC), exceto no período de 15 dias no qual o DA apresentou uma redução no nível glicêmico final de 47,21% em relação DC.
 - Quanto a diferença entre a glicemia final e glicemia inicial ocorreu em todos os animais um aumento nos índices, exceto no período de 15 dias nos animais do grupo DC que reduziram 119 mg/dL.
-

Figura 9 - Média e Desvio Padrão da Uréia Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 9, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A uréia nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período exibindo um valor médio de 32 mg/dL.
- A uréia nos animais diabéticos, foi similar entre grupos por período, porém, durante todos os períodos experimentais estudados foi em média 268% maior em relação aos animais dos grupos controles.

Figura 10 - Média e Desvio Padrão das Proteínas Totais Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 10, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- As proteínas totais nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período exibindo um valor médio de 6,9mg/dL, exceto aos 90 dias, no qual observa-se uma redução com o uso do chá.
- Nos animais DA, 15 e 30 dias, as proteínas totais foram em média 87% menor em relação aos animais do grupo controle água. Em relação ao uso do chá nos animais diabéticos, observou-se uma redução das proteínas totais nos períodos de 30, 60 e 90 dias, quando comparados aos controles (água/chá).

Figura 11 - Média e Desvio Padrão da Albumina Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 11, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A albumina nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Não houve diferenças significantes, nos valores da albumina, em relação DA e DC por período, porém houve uma redução em relação aos controles, ficando caracterizado aos 90 dias.

Figura 12 - Média e Desvio Padrão do Colesterol final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 12, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Não houve diferenças estatísticas entre os grupos CA, CC, DA e DC, em todos os períodos experimentais. No entanto, nos períodos de 30 e 90 dias os animais diabéticos, mostraram uma tendência na diminuição do nível de colesterol final, quando comparados aos controles.

Figura 13 - Média e Desvio Padrão do Triglicérides Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 13, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Não houve diferença estatísticas, nos valores do triglicérides, entre os grupos CA, CC, DA e DC, em todos os períodos experimentais.

Figura 14 - Média e Desvio Padrão da Creatinina Final (mg/dL) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 14, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A creatinina nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Não houve diferenças significantes nos valores da creatinina, em relação DA e DC nos períodos 15, 60 e 90 dias, porém com 30 dias, DA apresentaram um valor de 57,1% maior, em relação ao grupo controle água, e nos DC o valor foi 60% maior em relação ao grupo controle chá.

5.3 DADOS DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR

Os valores da massa da glândula submandibular dos ratos controles e diabéticos, nos períodos experimentais de seguimento, estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Média e Desvio Padrão da Massa Fresca da Glândula Submandibular (g) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 15, bem como a análise estatística dos dados, mostraram que, a massa da glândula submandibular no período inicial (15 dias) e final (90 dias) do experimento não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

- No período de 30 dias, observou-se uma diferença estatística entre a massa glandular do DA, de 29,3% menor em relação ao controle água, no DC houve uma redução de 37% quando comparado ao controle água e 28% em relação ao controle chá.

- Os animais diabéticos de 60 dias, como DA, apresentaram uma diminuição de 33,33% em relação ao grupo controle água, e 31,71% em relação ao controle chá, nos DC a diminuição foi de 29,3% em relação ao grupo controle chá, e 31% em relação ao controle água.

5.3.1 Dados morfológicos da glândula submandibular

Algumas imagens representativas das glândulas submandibulares dos grupos controles e diabéticos nos diferentes períodos experimentais estão apresentadas nas Figuras de 16 a 23.

5.3.1.1 Período de 15 dias

No período experimental de 15 dias, as glândulas submandibulares dos grupos controles **CC** (Fig. 16A) e **CA** (Fig. 16B) apresentavam características morfológicas de uma glândula ainda em desenvolvimento, com ácinos ocupando grande parte da glândula, contendo células acinosas com núcleo esférico situado na porção basal da célula, basofilia basal (coloração azul arroxeado ao HE referente ao ergastoplasma) e citoplasma acidófilo, enquanto que, os ductos granulosos mostravam-se menos abundante, de menor calibre em relação aos dos períodos experimentais de 60 e 90 dias (comparar as Figuras 16 com 20 e 22). Já, os demais ductos não apresentaram diferenças significativas com relação aos demais períodos experimentais e com característica de normalidade. Assim, os ductos intercalares apresentavam-se pequenos quanto ao diâmetro, revestidos por células cúbicas baixas, com núcleo central e escasso citoplasma e lúmen reduzido. Já, os ductos estriados, com calibre similar ou pouco menor em relação aos dos ductos granulosos exibiam células colunares com citoplasma acidofílico, núcleo central e as características estriações basais (dobras profundas da membrana plasmática basal em direção ao interior do citoplasma). Os ductos excretores mostravam-se mais calibrosos e estavam circunscritos por um estroma denso, seu lúmen era amplo e as

células cúbicas com núcleo central ocupando grande parte da célula. O estroma era composto por tecido conjuntivo fibroso ricamente vascularizado e mais evidente principalmente nos períodos experimentais de 60 e 90 dias.

Nestes períodos (60 e 90 dias), as glândulas submandibulares dos grupos diabéticos **DC** (Fig. 17A) e **DA** (Fig. 17B) exibiram alterações principalmente quanto aos ductos granulosos que se mostraram menos abundantes, calibre reduzido e células mais baixas. Comparar as Figuras 16B (CA) e 16A (CC) com a 17B (DA) e 17A (DC). Já, os ácinos no grupo DC (Fig. 17A) mostram-se maiores, contendo células acinosas com citoplasma mais eosinofílico, e núcleos picnóticos localizados na posição suprabasal. Com relação as demais estruturas ductos intercalares, ductos estriados, ductos excretores e estroma não foi observadas alterações morfológicas significativas em relação aos observados no grupo controle.

Figura 16 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 15 dias. **A)** *Controle chá*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Controle água*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas. HE e objetiva 40x

Figura 17 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 15 dias. **A)** *Diabético chá*: notar o aumento citoplasmático dos ácinos (Ac) em relação ao do controle e suas células são mais eosinofílicas, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes, os ductos intercalares (seta vermelha), e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Diabético água*: notar que os ácinos (Ac) embora apresentem tamanho similar ao do controle o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes e os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes. HE e objetiva 40x

5.3.1.2 Período de 30 dias

As glândulas submandibulares dos grupos controles **CC** (Fig.18A) e **CA** (Fig. 18B) exibiram características morfológicas similares aos observados no período experimental de 15 dias, exceto os ductos granulosos que mostravam-se mais calibrosos devido ao aumento do volume citoplasmático de suas células (comparar Figura 16 com Figura 18).

Nos grupos diabéticos **DC** (Fig. 19A) e **DA** (Fig. 19B), os ácinos ocupavam quase que a totalidade da glândula devido a drástica redução dos ductos granulosos. Neste caso, os ductos granulosos exibiram calibre reduzido devido a redução do volume citoplasmático de suas células (comparar as Figuras 18A (CC) e 18B (CA) com a 19A (DC) e 19B (DA). Já, os ácinos, principalmente no grupo DC (Fig. 8A) apresentavam células com citoplasma mais eosinofílicos, núcleos picnóticos localizados na posição suprabasal e redução da basofilia basal (comparar Figuras 18 e 19). Os ductos estriados também exibiram redução quanto ao diâmetro devido a diminuição do volume de suas células, além de redução das características estriações basais. Com relação as demais estruturas como ductos intercalares, ductos excretores e estroma não foram observadas alterações morfológicas significativas em relação aos observados no grupo controle.

Figura 18 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 30 dias. **A)** *Controle chá*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Controle água*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas. HE e objetiva 40x

Figura 19 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 30 dias. **A)** *Diabético chá*: notar que os ácinos (Ac) embora apresentem tamanho similar ao do controle o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes, os ductos intercalares (seta vermelha), e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Diabético água*: notar que os ácinos (Ac) embora apresentem tamanho similar ao do controle o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes e os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes. HE e objetiva 40x

5.3.1.3 Período de 60 dias

As glândulas submandibulares dos grupos controles **CC** (Fig. 20A) e **CA** (Fig. 20B) exibiram características morfológicas da glândula de um animal adulto, com ácinos e ductos granulosos volumosos e mais compensados, levando a redução no volume do estroma e menor evidência dos ductos intercalares. Neste caso, os ductos granulosos ocupavam maior percentual da glândula e seu diâmetro apresentava-se bem maior em relação aos períodos experimentais de 15 e 30 dias (comparar as Figuras 16 com 18 do grupo CA; e 16 com 18 do grupo CC). Neste período, os ductos estriados e os ductos excretorios mostraram-se também mais amplos em relação aos períodos anteriores.

Já, nos grupos diabéticos **DC** (Fig. 21A) e **DA** (Fig. 21B), as alterações morfológicas são similares às observadas no período de 60 dias (comparar Figuras), ou seja, os ácinos apresentavam células com citoplasma mais eosinofílicos, núcleos picnóticos localizados na posição suprabasal e redução ou ausência da basofilia basal, enquanto que, os ductos granulosos exibiam calibre reduzido e redução do volume de suas células.

Figura 20 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 60 dias. **A)** *Controle chá*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Controle água*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas. HE e objetiva 40x

Figura 21 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 60 dias. **A)** *Diabético chá*: notar que os ácinos (Ac) embora apresentem tamanho similar ao do controle o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes, os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Diabético água*: notar que os ácinos (Ac) embora apresentem tamanho similar ao do controle o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes com volume celular diminuído e os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes. HE e objetiva 40x

5.3.1.4 Período de 90 dias

As glândulas submandibulares dos grupos controles **CC** (Fig. 22A) e **CA** (Fig. 23B) exibiram características morfológicas similares ao do período experimental de 60 dias (comparar as Figuras 20 com 22 do grupo CA e 20 com 22 do grupo CC).

Já as glândulas dos animais dos grupos diabéticos **DC** (Fig. 23A) e **DA** (Fig. 23B), exibiram maiores alterações nas estruturas secretoras em relação aos períodos anteriores (comparar as Figuras 21 com 123 do grupo DA e 21 com 23 do grupo DC). Os ácinos apresentaram células com maior volume citoplasmático e eosinofilia, além da presença de núcleos picnóticos localizados na posição suprabasal e ausência da basofilia basal. Já os ductos granulosos eram mais raros, embora suas células apresentassem características similares aos dos demais períodos, indicando uma possível redução em comprimento. O mesmo foi observado quanto os ductos estriados. As demais estruturas não apresentaram diferenças morfológicas significativas.

Figura 22 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 90 dias. **A)** *Controle chá*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Controle água*: observar os ácinos (Ac) com células acinosas contendo núcleo esférico situado na porção basal da célula (cabeça de seta) e citoplasma acidofílico, ductos granulosos (DG) contendo células com vasto citoplasma eosinofílico e núcleo basal, ducto intercalar (seta vermelha) e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas. HE e objetiva 40x

Figura 23 - Fotomicrografia da glândula submandibular de rato no período experimental de 90 dias. **A)** *Diabético chá*: notar o aumento citoplasmático dos ácinos (Ac) em relação ao do controle e suas células são mais eosinofílicas, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes, os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes, e o estroma (seta preta) envolvendo as estruturas; **B)** *Diabético água*: notar que os ácinos (Ac) possuem um aumento citoplasmático quando comparados ao controle, o citoplasma das suas células são mais eosinofílico, os ductos granulosos (DG) são menos abundantes e os ductos intercalares (seta vermelha) mais evidentes. HE e objetiva 40x

5.3.2 Dados morfométricos da glândula submandibular

5.3.2.1 Densidade Volume

Os valores obtidos para densidade de volume (%) dos: ácinos, ductos granuloso, ductos intercalares, ductos estriados, ductos excretores e estroma das glândulas submandibulares dos ratos controles e diabéticos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas Figuras 24, 25, 26, 27 e 28.

Figura 24 - Média e Desvio Padrão da Densidade de Volume do Ácino (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 24, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume dos ácinos nos animais CA e CC, não apresentou diferenças significantes entre os períodos, exceto, 60 dias, no qual o CC foi 1,12 vezes maior em relação ao controle água.
- Nos diabéticos água e chá observou-se um aumento de 1,53 vezes, em média, em relação aos controles, sendo mais evidente no período de 90 dias.

Figura 25 - Média e Desvio Padrão da Densidade de Volume do Ducto Granuloso (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 25, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume dos ductos granulosos nos animais CA e CC, não apresentou diferenças significantes entre os períodos, exceto, 60 dias, no qual o CC foi 0,17 vezes menor em relação ao controle água.
- Nos diabéticos água e chá observou-se uma diminuição de 0,4 vezes, em média, em relação aos controles, sendo mais evidente no período de 90 dias, e diretamente proporcional ao período experimental.

Figura 26 - Média e Desvio Padrão da Densidade de Volume do Ducto Intercalar (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 26, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume dos ductos intercalares em todos os grupos e períodos experimentais, não apresentou diferenças significantes, no entanto, pode-se observa um aumento destas estruturas nos períodos experimentais de 30, 60 e 90 dias quando comparadas a 15 dias.

Figura 27 - Média e Desvio Padrão da Densidade de Volume do Ducto Estriado (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 27, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume dos ductos estriados em todos os grupos, dos períodos experimentais 15, 60 e 90 dias, não apresentaram diferenças significantes. No entanto, observa-se uma redução desta estrutura nos períodos 60 e 90 dias, quando comparadas ao início do experimento.
- No período experimental de 30 dias, houve uma diminuição de 0,38 vezes do CC, 0,42 vezes do DC e 0,54 vezes do DA quando comparados ao controle água.

Figura 28 - Média e Desvio Padrão da Densidade de do Volume Ducto Excretor (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 28, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Nos períodos, 30, 60 e 90 dias não se observa diferença significativa entre os grupos.
- No ducto excretor, 15 dias, houve uma redução da densidade volume de 0,54 e 0,48 vezes no DA e CC, respectivamente, em relação ao controle água.

Figura 29 - Média e Desvio Padrão da Densidade de Volume do Estroma (%) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 29, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume do estroma, 15 e 30 dias, não apresentaram diferença significante entre os grupos.
- No estroma do DC, 60 dias, houve uma redução de 0,40 vezes em relação ao controle chá.
- No DA e DC, houve uma redução de 0,6 vezes, em média, em relação aos controles no período de 90 dias.

5.3.2.2 Volume Total

Os valores obtidos para o Volume Total de: ácinos, ductos granulosos, ductos intercalares, ductos estriados, ductos excretores e estroma das glândulas submandibulares dos ratos controles e diabéticos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas Figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 35.

Figura 30 - Média e Desvio Padrão do Volume Total dos Ácino (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 30, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Os CA e CC não apresentaram diferença estatística em todos os períodos experimentais.
- Os animais diabéticos (água/chá) não apresentaram diferença significativa, exceto aos 90 dias, no qual o volume total dos ácinos, no DC foi maior 37,2% em relação ao controle chá, e 40,1% no controle água.

Figura 31 - Média e Desvio Padrão do Volume Total do Ducto Granuloso (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 31, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume total dos ductos granulosos, nos animais controles (água/chá) 15, 30 e 90 dias, não apresentaram diferenças significantes. Em 60 dias, o CC apresentou uma redução de 21% relação ao controle água.
- Nos animais DA e DC, houve uma redução do ducto granuloso de 45%, em média, em relação aos controles. Essa diminuição foi mais acentuada, aos 90 dias, no qual o DC apresentou uma redução de 59,2% e 62,14% em relação, respectivamente, ao controle chá e água. No DA essa redução foi de 62,24% para o controle chá e 65% para o controle água.

Figura 32 - Média e Desvio Padrão do Volume Total do Ducto Intercalar (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 32, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume total dos ductos intercalares não apresentou diferenças significantes em todos os grupos e períodos experimentais.

Figura 33 - Média e Desvio Padrão do Volume Total do Ducto Estriado (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 33, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume total dos ductos estriados, 15, 60 e 90 dias, não apresentaram diferenças significantes em todos os grupos e períodos experimentais. No entanto, há uma tendência na diminuição dos ductos estriados com o aumento dos períodos experimentais.
- O ducto estriado, dos animais dos períodos de 30 dias, apresentou uma redução de 46% no CC, 70% no DA, 63,3%, no DC em relação ao controle água.

Figura 34 - Média e Desvio Padrão do Volume Total do Ducto Excretor (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 34, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- A densidade volume dos ductos excretores nos controles água e chá, 30, 60 e 90 não apresentaram diferenças significantes. No período de 15 dias o CC demonstrou uma redução de 43,2% em relação ao controle água.
- Os grupos diabéticos, não apresentaram, em todos os períodos experimentais, uma significativa diferença entre si. No período de 30 dias observou-se no DC uma redução de 31,63%, e no DA uma de 27,3% em relação ao controle água.

Figura 35 - Média e Desvio Padrão do Volume Total do Estroma (mm³) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 35, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Os animais dos grupos controles, não houve diferença significativa, no volume total do estroma entre grupos por período experimentais.
- Nos animais diabéticos (água/chá) observa-se uma redução de 54%, em média, em relação aos controles, nos períodos experimentais de 30, 60 e 90 dias.

5.3.2.3 Número de Células

Os valores obtidos para o Número de Células de ácinos e ductos granulosos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas Figuras 36 e 37 .

Figura 36 - Média e Desvio Padrão do Número de Células Acinosas (10×10^6) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 36, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Nos animais dos grupos controles, não houve diferença significativa, no número de células entre grupos por período experimentais.
- Nos animais diabéticos (água/chá) observa-se uma redução de 65%, em média, em relação aos controles, nos períodos experimentais de 15 e 90 dias.

Figura 37 - Média e Desvio Padrão do Número de Células do Ducto Granuloso (10×10^6) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 37, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- Os animais controles água e chá, não observou-se diferença significativa, no número de células do ducto granuloso entre grupos por período experimentais.
- Nos animais diabéticos não houve diferença significativa, no número de células do ducto granuloso entre grupos por período experimentais. No entanto, observa-se uma redução dos DA e DC de 53%, em média, em relação aos controles, nos períodos experimentais de 30, 60 e 90 dias. Sendo mais acentuado em 90 dias, no qual o DC apresentou-se 61% menor em relação ao controle chá e 66% em relação ao controle água, no DA a diminuição foi de 48% para o controle chá e 54,3% em relação ao controle água.

5.3.2.4 Volume Celular

Os valores obtidos para o Volume Celular de células acinosas e células de ductos granulosos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas figuras 38 e 39.

Figura 38 - Média e Desvio Padrão do Volume da Célula Acinosa (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 38, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume da célula acinosa nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Nos períodos experimentais 15 e 90 dias houve um aumento de 170%, em média, dos DA e DC em relação aos controles, essa diferença é mais acentuada aos 90 dias, quando os DA apresentaram um aumento de 120% em relação ao controle água e 95% para o controle chá, nos DC o aumento foi de 87% quando comparados ao controle chá e 111% em relação ao controle água.

Figura 39 - Média e Desvio Padrão do Volume das Células do Ducto Granuloso (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 39, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume celular do ducto granuloso nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Nos períodos experimentais 30, 60 e 90 dias houve uma diminuição do volume celular do ducto granuloso nos DA e DC em relação aos controles, sendo mais evidente aos 60 dias, no qual os animais DA apresentaram uma redução de 45,3%% em relação ao controle água e 45% para o controle chá, e nos DC a redução foi de 37% para ambos os controles.

5.3.2.5 Volume Citoplasmático

Os valores obtidos para o Volume citoplasmático de ácinos e ductos granulosos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas Figuras 40 e 41.

Figura 40 - Média e Desvio Padrão do Volume Citoplasmático da Célula Acinosa (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 40, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume citoplasmático do ácino nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Nos períodos experimentais 15 e 90 dias houve um aumento do volume citoplasmático do ácino de 170%, em média, dos DA e DC em relação aos controles, essa diferença é mais acentuada aos 90 dias, quando os DA apresentaram um aumento de 123,2% em relação ao controle água e 97% para o controle chá, e nos DC esse aumento foi de 89% quando comparados ao controle chá e 114% relação controle água.

Figura 41 - Média e Desvio Padrão do Volume Citoplasmático da célula do Ducto Granuloso (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 41, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume citoplasmático do ducto granuloso nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Nos períodos experimentais 30 e 60 dias houve uma diminuição do volume citoplasmático do ducto granuloso nos DA e DC em relação aos controles de 63,4%, em média.

5.3.2.6 Volume Nuclear

Os valores obtidos para o Volume nuclear de células acinosas e ductos granulosos, nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias de seguimento, são apresentados nas Figuras 42 e 43.

Figura 42 - Média e Desvio Padrão do Volume Nuclear de célula acinosa (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 42, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume nuclear das células acinosas nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- Nos períodos experimentais 15, 30 e 60 dias DA e DC não apresentaram diferença estatística entre os grupos por período experimental. Em 90 dias, os animais do grupo DA apresentaram uma diminuição de 5% em relação ao DC.

- No período de 15 dias, os DA apresentaram uma diminuição de 19,13% em relação ao controle água. Em 90 dias, os animais do grupo DA apresentaram um aumento de 5% em relação ao controle chá. Nos DC esse aumento foi de 10% quando comparados ao controle chá e 9% em relação controle água.

Figura 43 - Média e Desvio Padrão do Volume Nuclear Ducto Granuloso (μ^3) dos animais dos grupos controle e experimental de 15, 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes significam $p < 0,05$ entre grupos do mesmo período

As análises da Figura 43, bem como das análises estatísticas dos dados, mostraram que:

- O volume nuclear dos ductos granulosos nos animais dos grupos CA e CC não apresentaram diferença estatística entre grupos por período experimentais.
- No período experimental 30 dias, no DA observou-se uma redução de 17%, em relação ao controle água.
- Os animais DA, no período de 60 dias, apresentaram uma redução de 16% e 18,4%, respectivamente, para o controle água e chá.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos em tópicos: o modelo experimental; o uso do chá para o controle da glicemia; alterações clínicas e nas dosagens bioquímicas quanto ao diabetes e sua terapêutica com chá verde; as glândulas submandibulares e a manutenção da saúde bucal; alterações nas glândulas submandibulares quanto ao diabetes; terapêutica do chá verde e as glândulas submandibulares em diabéticos; e as aplicações futuras.

6.1 O MODELO EXPERIMENTAL

Um relevante problema de saúde pública, o diabetes, independente do seu grau de desenvolvimento, tem acarretado elevados índices de morbidade e de mortalidade (MARQUES, 2005). No Brasil, segundo Costa, Almeida e Neto (2009), foi estimada a prevalência de diabetes em torno de 7,6% da população. Tomando-se por base a população sadia, as pessoas com diabetes têm 25 vezes maior probabilidade de desenvolver cegueira, são 17 vezes mais propensas a sofrer de doença renal, têm 20 vezes mais chance de ter uma gangrena. Além disso, pode elevar em duas vezes nos homens e quatro vezes nas mulheres o risco de doença das artérias coronárias, aumentando em duas vezes a chance de apoplexia, quando comparado a uma pessoa sem diabetes (DAVIDSON, 2001).

A indução química do diabetes experimental tem sido amplamente utilizada devido a sua padronização e fácil execução. Esta ocorre por intermédio da administração da estreptozotocina e da aloxana cuja citotoxicidades são específicas para as células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas (LERCO et al., 2003). O modelo experimental, ratos machos Wistar adultos, utilizado no presente estudo, foi adotado por suas vantagens como fácil manuseio, baixo custo, maior resistência a infecções e, principalmente, pela semelhança dos tecidos a reposta humana (SCHELLINI et al., 1995; LALLA et al., 2000; SCHMIDT, 2005). A técnica de indução, do presente estudo, foi fundamentada na metodologia de Simon e West

(1991), os quais estudando a administração, na dose 50mg/Kg, em ratos Wistar, encontraram diabetes em 100% dos animais e foi duradoura. No presente estudo, a indução do diabetes foi de 85% e duradoura.

Sugere-se que a ação celular da estreptozotocina esteja envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio molecular capazes de promover alquilação de bases de ácidos desoxirribonucleico (DNA) em vários níveis, as quais, quando reparadas causam alterações fatais no metabolismo de células beta por acarretarem depleção de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (ADN). Pesquisas recentes relatam que o óxido nítrico pode estar envolvido ao mecanismo de citotoxicidade desta droga (ASPLUND et al., 1984) .

6.2 O USO DO CHÁ PARA O CONTROLE DA GLICEMIA

Os Radicais livres derivados do oxigênio, mais conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), representam a principal classe de radicais gerados nos sistemas vivos, tendo como característica a capacidade em desempenhar tanto efeitos benéficos (baixas ou moderadas concentrações) quanto maléficos (altas concentrações) nesses organismos (VALKO et al., 2004). EROS em altas concentrações podem mediar o dano causado em estruturas celulares, assim como lipídeos, membranas, proteínas e ácidos nucleicos (POLI et al., 2004), resultando em estresse oxidativo. Os principais EROS incluem o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (KOIKE e MIYOSHI, 2006). O EROS considerada mais reativa em sistemas biológicos é o radical hidroxil, podendo modificar as bases do DNA, inativar proteínas, bem como participar da oxidação dos ácidos graxos das membranas celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Na diabetes, o excesso de glicose pode levar a glicação de proteínas, que leva a inativação de enzimas. A glicose pode sofrer uma auto-oxidação, gerando nesse processo ânions superóxidos, ou ainda, ativar a enzima NADPH oxidase, que reduz o NADPH (JIANG et al., 1990; KENNEDY e LYONS, 1997; OPARA, 2004), este pode causar peroxidação lipídica, desestruturação da membrana celular, interferir na atividade celular e danificar tecidos (NOGUEIRA, 2004).

Para combater o EROS, o organismo necessita dos sistemas antioxidantes, presente em nosso organismo como catalase, glutathione peroxidase e superóxidos dismutase. Nos diabéticos, o organismo tende a aumentar diferencialmente a produção ou atividade destes antioxidantes nos tecidos para evitar os danos decorrentes do aumento da EROS. Estudos com ratos diabéticos verificaram aumento das atividades antioxidantes do superóxido desmutase e catalase no coração (KAKKAR et al., 1995), do superóxido desmutase e glutathione peroxidase no rim (LIMAYE, RAGHURAM, SIVAKAMI, 2003; UGOCHUKWU e COBOURNE, 2003), da catalase e superóxidos dismutase no pâncreas (WOHAIEB e GODIN, 1988; KAKKAR, 1995) e do superóxidos dismutase em glândulas submandibulares (BARROSO et al., 2003).

A *Camellia sinensis*, vem sendo amplamente estudada, em função das suas propriedades medicinais, devido aos polifenóis em especial as catequinas (ECG) e as epigallocatequinas (EGCG) com funções antioxidantes (SABU, SMIHTA, KUTTAN, 2002; YOKOZAWA, NAKAGAWA, KITANI, 2002; SKRZYDLEWSKA et al., 2002), tendo seu uso propostos como terapêutica para várias patologias dentre elas o diabetes. Evidências sugerem ainda que a ingestão diária de antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, é capaz de retardar o aparecimento destas doenças (MANFREDINI, MARTINS, BENFATO, 2004).

No atual trabalho inicialmente tentamos determinar a peroxidação lipídica na glândula submandibular dos ratos utilizando o método descrito por Buege, J. A. e Aust, S. D. (1978), porém dificuldades (padronização, quantidade de material, e tempo, viés da metodologia) levaram a perda do material coletado nos períodos de 15 e 30 dias e a resultados inapropriados, provavelmente e principalmente devido a pequena quantidade do material. Assim nos materiais coletados nos períodos de 30 e 90 dias optamos por determinar a partir do “pool” de 5 glândulas. Os resultados apresentados no **Apêndice A**, mostraram que, nos animais que consumiram chá houve uma tendência de redução na peroxidação lipídica (CA = 2,88 nmol/g de tecido em ambos períodos; DA = 3,36 (60d) e 3,46 (90d); CC = 2,77 (60d) e 2,5 (90d); DC = 2,21 (60d), 2,3 (90d).

Com relação à provável melhora nos índices glicêmicos nos animais na terapêutica com chá verde verificamos que ocorreu um aumento nos índices glicêmicos em todos os animais entre 7º dia da indução (período inicial) e o término

dos respectivos períodos experimentais de 30 (77,2 mg/dL nos DA; 165,8 mg/dL nos DA), 60 (28,4 mg/dL nos DA; 46,8 mg/dL nos DC) e 90 dias (13,8 mg/dL nos DA; 23 mg/dL nos DC). Já, no período experimental de 15 dias, todos os animais do grupo DA apresentaram aumento nos índices glicêmicos (média de 87,8 mg/dL) em relação ao seu período inicial, enquanto que todos os animais do grupo DC reduziram os índices glicêmicos, sendo que, a menor redução foi de 55mg/dL e a maior de 279 mg/dL (média 119 mg/dL). Com relação ao grupo controle ocorreu em todos os períodos experimentais aumento dos índices glicêmicos finais em relação aos iniciais.

Nossos resultados mostram que, nos períodos iniciais de 15 dias, o consumo do chá-verde (*Camellia sinensis*) como dieta líquida promove uma redução da glicemia, porém nos estados crônicos da doença o chá não tem efeito hipoglicemiante. Esses achados estão de acordo com Wu et al.,(2004). Em relatos sobre plantas medicinais utilizadas com a finalidade hipoglicemiante, os períodos experimentais são curtos, até 30 dias, sugerindo apenas o efeito das mesmas no diabetes inicial (KAMTCHOUING et al., 1997; CECIM, 2000; SINGH et al., 2001; CARDENAS, 2005).

Segundo Martha et al. (2000), uma droga só é considerada eficaz quando reduz o nível em pelo menos 15%. Portanto, essa redução foi observada apenas no período inicial do experimento (15 dias) do presente estudo. Possivelmente pelo fato dos animais apresentarem um estado leve a moderado do diabetes experimental, sendo que essas plantas na maioria das vezes, atuam sobre as células beta pancreáticas, estimulando a produção de insulina (NEGRI, 2005). Pode-se comparar os presentes resultados com Yadav et al. (2002), no qual utilizou a *Murraya koeingii*, para a mesma finalidade que o presente estudo, e a sua ação foi atribuída a estimulação das células beta e liberação de insulina, uma vez que o extrato não apresentou alterações no tratamento do diabetes com nível glicêmico muito alto.

Também pode-se interpretar que no diabetes severo, a quantidade de células beta resistente a toxicidade da droga seja pequena e não suficiente para a atuação dos princípios ativos da *Camellia sinensis*. Grover et al. (2000), citaram que a diminuição da glicose plasmática é dependente do protocolo de indução de diabetes, que variam na intensidade da hiperglicemia, relatando que o efeito hipoglicemiante

de qualquer planta é dependente da dose do agente diabetogênico e do grau de destruição de células beta.

Com a análise desses relatos seriam necessários estudos mais detalhados para observar a atuação da *Camellia sinensis*. Fatores como tipo e/ou linhagem de animal, a concentração e/ou tipo da droga utilizada para ocasionar o diabetes, a procedência da planta e/ou princípio ativo, o método de tratamento dos animais, o método de preparo da infusão ou extrato utilizado, e o período experimental, podem interferir na discussão dos resultados.

No nosso experimento a água do grupo experimental com tratamento foi substituída por uma infusão de chá verde (*Camellia sinensis*) comprada no comércio de Bauru (SP) proveniente da marca Essência Verde: Comércio de produtos naturais LTDA (Anexo B). Como queríamos simular o uso natural da população humana com o uso do chá, seguimos as mesmas orientações do fabricante e comerciantes, colocando 7g de folha seca em um litro de água e aquecemos até o ponto de fervura e deixamos em infusão por 10 minutos.

Uma variável de nossa pesquisa que deve ser considerada é o fato de termos oferecido aos animais do grupo terapêutico somente chá como alimento líquido. Não sabemos até que quantidade e periodicidade o chá é benéfico, apesar de ouvirmos relatos em revistas não científica de pessoas que substituem a água potável pelo chá.

6.3 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E NAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS QUANTO AO DIABETES E SUA TERAPÊUTICA COM CHÁ VERDE

A utilização de uma única dose de 50mg/Kg de massa corporal de estreptozotocina injetada intraperitoneal foi eficaz na indução do diabetes em 85% dos animais sobrevivente, exibindo em média mg/dL de glicemia sanguínea no início do experimento (7º dia após a indução). Como comentado no item anterior todos os animais exibiram aumento dos índices glicêmicos após o término dos períodos experimentais, exceto os animais do grupo DC do período de 15 dias.

Comparativamente, trabalhos com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina também obtiveram elevado índices glicêmicos, de 400mg/dl após 2 meses de indução (MAHAY et al., 2004) , 89mg/100mL após 8 semanas de indução (NICOLAU et al., 2005) e de 3.5mmg/dl após 30 dias de indução (NOGUEIRA et al., 2004), utilizando diferentes dosagens da droga.

O diabetes mostra glicemia alterada e também pode alterar outros parâmetros bioquímicos.

No presente estudo os valores médios obtidos para os ratos controles sem chá foram: uréia 32,5 (mg/dL), proteínas totais 7 (mg/dL), albumina 3 (mg/dL), colesterol 80 (mg/dL), triglicérides 83 (mg/dL), e creatinina 0,5 (mg/dL). Em ratos diabéticos sem chá os valores foram: uréia 91 (mg/dL), proteínas totais 6,2 (g/dL), albumina 2,6 (mg/dL), colesterol 78 (mg/dL), triglicérides 117 (mg/dL), e creatinina 0,4 (mg/dL).

Em Cardenas, 2005, que estudou ratos diabéticos induzido por 60mg/Kg estreptozotocina num período experimental de 45 dias, observou-se em ratos não diabéticos uréia 37 (mg/dL), proteínas totais 7 (mg/dL), albumina 3 (mg/dL), colesterol 91 (mg/dL), triglicérides 61 (mg/dL), e creatinina 1 (mg/dL). Em animais diabéticos os valores foram uréia 105 (mg/dL), proteínas totais 5 (g/dL), albumina 3 (mg/dL), colesterol 46 (mg/dL), triglicérides 44 (mg/dL), e creatinina 1 (mg/dL).

Os resultados do colesterol e triglicérides verificados no presente estudo, não estão de acordo com os relatos da literatura quanto a ação dos antioxidantes (chá verde), na regulação do nível dos metabólitos do plasma. Segundo Kirk et al. (1998), o aumento da atividade dos receptores de LDL, provocado pelos antioxidantes, resultaria na redução destes níveis no diabetes.

Segundo Wu et al., 2004, o chá verde demonstrou uma diminuição significativa no nível de triglicérides dos ratos, após 12 semanas de tratamento, nesta pesquisa no foi possível confirmar esses achados, talvez, devido ao elevado coeficiente de variação entre os ratos, para obtenção desse parâmetro.

A análise das proteínas totais demonstraram uma redução significativa entre os animais dos grupos controles (água/chá) e diabéticos (água /chá). Esse resultado já era esperado, pois o diabetes provoca depleção das proteínas totais, ou seja, a

capacidade de utilizar a glicose como fonte de energia resulta numa maior utilização e armazenamento diminuído das proteínas (GUYTON, 2002).

A redução da albumina em ratos diabéticos está de acordo com Nogueira et al. (2005). Esse resultado pode estar associado as glicações não enzimáticas causadas pelo estado de hiperglicemia do diabetes mellitus, ou ainda associado a uma provável microalbuminúria, geralmente causada pela nefropatia diabética, em virtude da instalação do quadro do diabetes (LOPES et al., 2001).

A elevação dos níveis de uréia nos ratos submetidos a estreptozotocina, são indicativos de catabolismo protéico. Neste sentido, em condições diabéticas a síntese protéica encontra-se diminuída em todos os tecidos, aumentando a atividade proteolítica muscular com o aumento de afluxo de aminoácidos para o fígado e estes aminoácidos elevam os níveis séricos de compostos nitrogenados como uréia e creatina (WELTON et al., 1996), conseqüentemente o excesso é excretado pelos rins.

Observamos nos resultados deste estudo que as diferenças estatísticas são mais evidentes na uréia do que na creatinina, isso talvez esteja relacionado ao período experimental, sendo que a uréia é mais sensível nas alterações primárias das condições renais, e esse aumento de valores nos exames indicam desidratação, aumento do consumo protéico, insuficiência renal e nefropatia, confirmando algumas alterações ocasionadas pelo diabetes. Esses resultados também foram relatados por Cardenas (2005).

6.4 AS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES E A MANUTENÇÃO DA SAÚDE BUCAL

A cavidade oral é mantida úmida pela saliva, a qual cobre o dente e mucosa. A saliva é um fluido complexo, produzida pelas glândulas salivares, cuja função mais importante é a manutenção e bem estar da boca (TEN CATE, 2008).

Uma diversidade de moléstias, como o *Diabetes Mellitus*, têm sido correlacionadas com as disfunções das glândulas salivares (NEDERFORS, 2000).

As principais complicações bucais ocorridas no diabetes incluem: hipossalivação, candidíase, doença periodontal, abscessos periapicais, hipocalcificação dentária, distúrbio na cicatrização, atraso na erupção dentária, recessão gengival, aumento na ardência e na severidade das cáries dentárias (FISKE, 2004; PONTES et al., 2004).

Relatos na literatura demonstram que pacientes com diabetes apresentam valores maiores de profundidade a sondagem, na perda de inserção e nos níveis de perda óssea, além de prevalência de periodontite avançada (GREGHI et al., 2002; JAHN, 2004). Desta forma o diabetes é considerado um fator de risco para a prevalência e severidade das doenças periodontais (CAMPUS et al., 2005; SALVI et al., 2005).

Claudino et al. (2007), acompanhou em modelo de diabetes experimental pela aloxana a progressão da doença periodontal de ratos em vários períodos de 30 dias a 1 ano e constatou que o diabetes prolongado sem tratamento leva ao aparecimento de cáries rampantes e perda de dente pela presença de bactérias e o periodonto de sustentação mesmo sem bactérias é afetado pelo descontrole da glicemia.

6.5 ALTERAÇÕES NAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES QUANTO AO DIABETES

A glândula submandibular dos períodos experimentais apresentou valores esperados para a massa glandular.

Um fato relevante quanto à estrutura da glândula é a idade do animal. No atual trabalho como comentado no item acima, os animais se encontravam em estágio de desenvolvimento, ou seja com 2 meses de vida, sendo que, no período experimental de 15 dias a idade era de 75 dias de vida e a massa das glândulas submandibulares dos animais do grupo CA, ou seja, grupo controle que foi fornecido água (grupo padrão sem interferência da doença ou da terapêutica) foi de 380 mg. Já, ao término do experimento os animais apresentavam cerca de 150 dias de idade e massa glandular dos animais do grupo CA foi de 440 mg, um aumento de 16%.

No grupo CA, aos 15 dias as glândulas exibiam ácinos circundados por maior quantidade de estroma e ductos granulosos menos evidentes cujas células apresentavam menor volume citoplasmático, ao ser comparado com os animais de 60 e 90 dias (comparar Figuras 16 e 17 período de 15 dias com 22 e 23 período de 90 dias). Morfometricamente, os ácinos não apresentaram alterações significativas quanto ao seu volume total e o número e volume de suas células. Porém, os ductos granulosos exibiram um volume total de $60,61 \text{ mm}^3$, aos 15 dias, ocupando apenas 21% da glândula, enquanto que, aos 90 dias passa para de $135,85 \text{ mm}^3$, ocupando 42% da glândula, um crescimento total de (124%). Este crescimento foi decorrente do aumento de 35% no volume de suas células, que aos 15 dias foi de $2442,77 \mu\text{m}^3$ e aos 90 dias $3287,98 \mu\text{m}^3$ e de 48% no número de células, que aos 15 dias foi de $151,39 \times 10^6$ e aos 90 dias de $224,70 \times 10^6$. Como já descrito (JACOB e LEASON, 1959; HIGH, SUTTON e HOPPER, 1985; ASSIS, 1991) os ductos granulosos estão ausentes no nascimento dos ratos, e desenvolve-se com o decorrer da idade. Esse acentuado aumento dos ductos granulosos leva a um aumento progressivo da relação ductos/ácinos, compactação das estruturas glandulares e consequentemente a uma redução do volume estromal (62%).

Nos animais diabéticos (DA) houve uma acentuada redução da massa glandular, principalmente nos períodos experimentais de 30 e 60 dias, quando comparado com o grupo controle, o qual já foi demonstrado em vários estudos (LIU e LIN, 1969; REUTERVING et al., 1987; ANDRESON e GARRETT, 2004; CHANGRANI et al., 2006), comprovando que a glândula salivar é um órgão afetado pelo diabetes.

No atual trabalho, alterações nas glândulas submandibulares dos animais DA foram observadas nas estruturas secretoras somente após o período de 30 dias. A ausência de alterações no período experimental de 15 dias pode estar atribuída ao estado inicial da doença no animal, uma vez que o nível glicêmico estava alterado, no entanto, o período da doença não foi suficiente para ocasionar alterações morfológicas significativas na glândula submandibular.

Nos DA, os ductos granulosos por estarem ainda em desenvolvimento foram os mais afetados não alterando o seu volume total durante o experimento. O número e o volume individual de suas células manteve-se constante durante todo período experimental, sendo em média de $2175,13 \text{ mm}^3$ e $102,64 \times 10^6$ células,

respectivamente. Aos 90 dias, quando comparado com o grupo CA, o número e o volume celular dos ductos granulosos no grupo DA foi 54% e 32% menores, respectivamente. Trabalho realizado por High, Sutton e Hopper, 1985, utilizando a mesma metodologia, verificou que a 18 semana de idade a relação ductos/ácino foi de 1,0 nos ratos do grupo controle, enquanto que, nos diabéticos a relação foi de apenas 0,55, referente ao animal de apenas 9 meses de idade. Para os autores a redução drástica na relação ductos/ácino é decorrente da falha da maturação principalmente dos ductos granulosos.

Com relação aos ácinos, no grupo DA o volume total não apresentou diferenças estatisticamente significantes com relação ao grupo CA, porém alterações foram observadas quanto a sua morfologia como aumento da eosinofilia citoplasmática e ausência da basofilia basal, indicativos de alteração no conteúdo protéico e na síntese protéica, além de núcleos picnóticos, indicativos de morte celular por apoptose. Segundo Nicolau et al. (2005), na glândulas parótida e submandibular de ratos diabéticos, ocorre a alteração do metabolismo do glicogênio, levando às mudanças no volume dos ácinos, que são caracterizado por um acúmulo de material secretor no interior do citoplasma. Estes acúmulos protéicos, muitas vezes, induzem a um processo degenerativo das células acarretando em morte celular e substituição por tecido conjuntivo (CUTLER et al., 1979).

Morfometricamente, alterações foram observado apenas aos 90 dias, quando o número de células acinosas foi 40 % menor e o volume individual de suas células foi 120% maior em relação ao grupo CA, mantendo o volume total dos ácinos na glândula. O mesmo foi observado por Anderson, Suleiman e Garrett (2004), no qual foi utilizado ratos diabéticos induzido por estreptozotocina , com 27, 90 e 180 dias, onde o volume proporcional dos ácinos e ductos granulosos permaneceu constante no grupo controle, ou seja, cerca de 48% e 38%, respectivamente. Em animais diabéticos, observou-se que a densidade volume dos ácinos apresentaram progressivamente um aumento de 62%, enquanto que nos ductos granulares houve uma redução de 20%.

Trabalhos anteriores realizado em nosso laboratório utilizando a aloxana como indutor químico da diabetes, avaliaram morfometricamente as alterações nas glândulas submandibulares (ALBERTI et al., 2004; FERREIRA et al., 2005) de ratos com 3 meses de idade, após 1, 3 e 6 meses de indução e verificaram alterações nas

glândulas apenas aos 3 meses de segmento, com redução da massa de 49% em relação ao controle, devido a diminuição no volume total dos acinos, ducto granulosos, estroma de 30,2%, 66,5% e 46,25%, respectivamente. Já Noorafshan, 2006, a redução ocorre somente no volume dos ácinos serosos de 38% em machos e 44% fêmeas, apenas nos grupos de 12 semanas seguimento. O presente estudo contraria os achados sobre massa glandular e ácinos, no entanto, esta de acordo com as alterações observadas no ducto granuloso.

Vale a pena salientar que, a hiperplasia (aumento no número de células) ou hipertrofia (aumento no tamanho da célula) celular nas glândulas parótidas e submandibulares em ratos diabéticos induzido quimicamente por aloxana, estreptozotocina foi observada por Anderson e Johnson (1981), Nogueira (2001) e Nogueira (2004). Segundo Anderson et al. (1985) e Hector, Linden (1987) essas alterações podem estar associadas a polifagia (ingestão excessiva de alimento sólido), uma das característica do estado diabético, a qual esta associada com o aumento da mastigação, podendo influenciar na atividade da glândula salivar. Neste estudo não observou-se a hiperplasia celular, apenas a hipertrofia.

Os dados obtidos nesta pesquisa indicam que dentre os ductos, os granulosos são os mais afetados pela diabetes, isto talvez esteja relacionados com as suas características morfológicas e possivelmente por ser mais sensível e ter um metabolismo mais aprimorado para produção de vários tipos diversificados de substâncias, como o fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de células mesenquimais, fator de crescimento de hepatomas, fator de crescimento de linfócitos tímicos, renina, eritropetina, enzimas amilase, protease e fosfatase ácida (JUNQUEIRA, 1949; LEVI-MONTALCINI e BOOKER, 1960; COHEN, 1962; ATTARDI, 1967; WEIMAR e HARAGUCHI, 1975; FAVA DE MORAES et al., 1979; DOINE, 1987; TANAKA, 1981). Estes ductos são responsáveis pelas alterações da composição salivar, no qual sendo afetado pelo diabetes, não poderá exercer sua função adequadamente, alterando o fluxo e a composição salivar, podendo resultar num acúmulo de deposito de material na membrana basal (HAND e WEISS, 1984).

6.6 TERAPÊUTICA DO CHÁ VERDE E AS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES EM DIABÉTICOS

Como observado nos parâmetros clínicos e laboratoriais o consumo de chá verde como único alimento líquido no grupo CC não interferiu no metabolismo do animal, mantendo a massa corporal, os índices glicêmicos e os níveis sorológicos de colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, uréia e creatinina similares aos do grupo CA. Com relação as glândulas submandibulares, no grupo CC não foi observado alterações quanto a morfologia da glândula, a massa glandular e os parâmetros morfométricos analisados, indicativos de que o chá não teve efeito tóxico mesmo sendo consumido como único alimento líquido.

Com relação à diabetes, as glândulas do grupo DC exibiram as mesmas alterações na massa glandular e nas características morfológicas e morfométricas observadas no grupo DA, indicando que a administração do chá verde não apresentou efeitos terapêuticos sobre as alterações glandulares decorrentes da diabetes. Por outro lado, as alterações morfológicas nas células acinosas como citoplasma mais eosinofílicos, núcleos picnóticos localizados na posição suprabasal e redução da basofilia basal foram mais marcantes nos animais DC.

Na ingestão hídrica, durante o experimento observou um aumento do consumo hídrico de 6 vezes, nos animais diabéticos, sendo que, média nos grupos CA e CC foi de $15,5 \pm 11$ mL/24h, enquanto que, no DA e DC foi de $110,9 \pm 40,3$ mL/24h, o que já era esperado. Talvez o consumo exacerbado do chá verde, tenha contribuído para os resultados negativos obtidos, pois na farmacologia sabe-se que o limiar da dosagem entre o efeito e toxicidade de um medicamento é pequeno.

6.7 APLICAÇÕES FUTURAS

Devido os achados neste estudo, sabendo-se que humanos consomem este e outros produtos naturais de maneira inadequada, podemos inferir a necessidade de novas pesquisas envolvendo a *Camellia sinensis*, pois conforme observou-se na utilização continua do chá, não houve efeito benéfico nem maléfico aos animais, no

entanto, seu uso pode afetar a composição salivar ou a microbiota bucal, observado através das alteração na parte secretora da glândula salivar.

O chá verde demonstrou um possível efeito hipoglicemiante em animais diabéticos, no início do experimento, isto sugere novos estudos relacionados ao efeito protetor/preventivo, ao invés de terapêutico, análise do mecanismo, atuação e princípio ativo, responsável por esta resposta.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados aqui obtidos constatamos que:

- a) A estreptozotocina administrada pela via endovenosa na dose de 50mg/Kg de peso corporal, induziu o diabetes experimental nos animais, confirmada pelas alterações nos aspectos clínicos, bioquímicos (uréia, proteínas totais, albumina e creatinina) e hiperglicemia persistente.
- b) A ingestão hídrica dos grupos diabéticos (DA e DC) foram em média 6 vezes maior em relação aos controles.
- c) Aos 15 dias, todos os animais dos grupos CA, CC e DA apresentaram aumento nos índices glicêmicos finais de, respectivamente, 45 mg/dL, 65 mg/dL e 88mg/dL em relação ao período inicial, enquanto que todos os animais do grupo DC tiveram seus índices reduzidos em média de 119 mg/dL. Nos demais períodos ocorreu aumento dos índices glicêmicos em todos os grupos.
- d) Nos ratos DA e DC o perfil bioquímico das proteínas totais e albumina foram menores em relação aos controles e o da uréia maior, enquanto que, o colesterol total e triglicérides não apresentaram diferenças.
- e) A massa corporal dos animais diabético foi em média X% menor em relação ao controle durante todo período experimental. Já, a massa das glândulas submandibulares dos diabéticos foi menor em relação aos controles apenas nos períodos experimentais de 30 e 60 dias.
- f) Os ácinos das glândulas submandibulares dos animais dos grupos DA e DC exibiram aumento da eosinofilia citoplasmática e ausência da basofilia basal, indicativos de alteração no conteúdo protéico e na síntese protéica, além de núcleos picnóticos, indicativos de morte celular por apoptose. Morfometricamente, o volume individual das células acinosas aumentou, enquanto que, o número total de células diminuiu, mantendo o volume total dos ácinos constante durante todo período experimental.

- g) Os ductos granulados, no grupo CA apresentaram aumento de 125% no seu volume total entre 15 e 90 dias, decorrente do desenvolvimento desta estrutura, aumentando o número e o volume celular. Já, nos DA e DC, o número e o volume individual das células manteve-se constante durante todo período experimental.

Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a glândula submandibular é um órgão afetado pelo diabetes e a terapêutica utilizada neste experimento (*Camellia sinensis*) não influenciou nos resultados obtidos e apenas mostrou um possível efeito hipoglicemiante, no período inicial de 15 dias do experimento.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacognosia.**, v. 17, n. 1, p. 114-30, jan/mar. 2007.

AHERNE, T. Thoracoscopy in management of pleural effusions. **Irish Medical Journal.**, v. 75, n. 11, p. 406-407. 1982.

ALBERTI, S. et al. Estudo morfométrico das glândulas parótidas de ratos com diabetes induzido pela aloxana. **Brazilian Oral Research**, v. 18, p. 243. 2004.

AL-GAITHI, F. et al. Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry.**, p. 1-7, feb. 2004.

ALTAN, N. et al. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. **Diabetical Research Clinical Practice**, v. 22 (2-3), p. 95-8.1994.

ANDERSON, L. C.; JOHNSON, D. A. Effect of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. **Comp. Biochem. Physiol. B**, 70B, p. 725-30. 1981.

ANDERSON, L. C. Effects of alloxan diabetes and insulin *in vivo* on rat parotid gland. **Am J Physiol.**, v.2 45, p. G431-G437. 1983.

ANDERSON, L. C.; GARRETT, J. R. Lipid Accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. **Archives Oral Biology**, v. 31, n. 2, p. 469-75. 1986.

ANDERSON, L. C, BEVAN, C. A. Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, n. 5, p.331-6. 1992.

ANDERSON, L. C. et al. In vivo secretory responses of submandibular glands in streptozotocin-diabetic rats to sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. **Cell Tissue Res.**, v. 274, p. 559-66. 1993.

ANDERSON, L. C.; GARRETT, J. R. The effects of streptozotocin-induced diabetes on norepinephrine and cholinergic enzyme activities in rat parotid and submandibular glands. **Arch Oral Biol.**, v. 39, p. 91-7. 1994.

ANDERSON, L. C.; GARRET, J. R. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilation. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 183-91. 2004.

ATKINSON, J. C.; WU, A. J. Salivary gland dysfunction: causes, symptoms, treatment. **J Am Dent Assoc.**, v. 125, p. 409-16. 1994.

ATTARDI, D. G.; SCHLESINGER, M. J. SCHLESINGER, S. Submaxillary gland of mouse: properties of purified protein affecting muscle tissue in vitro. **Science**, v. 156, p. 1253-5. 1967.

ASPLUND, K. et al. Partial protection against streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta. Endocrinol.**, v. 107, p. 390-4. 1984.

ASSIS, G. F. **Estudo morfométrico ultra-estrutural da célula secretora do ducto granuloso da glândula submandibular do camundongo. Comparação entre sexo.** 1991.139f. Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 1991.

BAILEY, C. I.; DAY, C. Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, n. 8, p. 553- 63. 1989.

BARROSO, A. S.; QUISSELL, D. O.; COLEPICOLO, P. Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. **Arch Oral Biol.**, v. 48, p.133-9. 2003.

BLANCO, R. A. **Chá verde. Disponível em:** <<http://www.jardim de flores.com.br/sinergia/S08chaverde.htm>>. Acesso em 27 mar. 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: Gleischer, S.; Packer, L., (Ed.). **Methods in Enzimology**. New York: Academic Press, v. 52C, p. 302-310. 1978.

CALDERON, I. R. M. P. et al. Diabetes and Pregnancy: an Update of the Problem. **Annual Review of Biomedical Sciences.**, v. 9, p. 1-11. 2007.

CAMPUS, G. et al. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 418-25. 2005.

CARDENAS, V. M. A. **Identificação dos ativos e o efeito das frações hidroalcolica e acetate de etila de folhas de *Smallathus sonchifolis* (yacón) sobre parametros bioquímicos em ratos wistar normais e com diabetes**

induzido por estreptozotocina. 2005. 102f. Dissertação. (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus. **Acta Cir Bras.**, v.18, p. 18-64. 2003.

CATE, T. Glândulas Salivares. In:_____. **Histologia Oral:** Desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro. Elsevier 2008. p. 290-318.

CHAJARA, A. et al. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20(6), p. 1480-87. 2000.

CHANGRANI, N. R. et al. Effects of streptozotocin-induced type1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated, and lacrimal glands of rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, p. 503-19. 2006.

CHÁVEZ, E. M. et al. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.89, p.305-11. 2000.

CHÁVEZ, E. M. et al. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 91, p. 166-73. 2001.

CLAUDINO, M. et al. Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats. **PLoS ONE.**, v. 2, n. 12. 2007.

COHEN, S. Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **J. biol. Chem.**, v. 237, p. 1555-62. 1962.

COSTA, A. A.; ALMEIDA NETO, J. S. **Manual de diabetes:** Educação, Alimentação, Medicamento, Atividades Físicas. 5ª ed. São Paulo, Sarvier. 2009.

CRESPY, V.; WILLIAMSON, G. A. Review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. **International J Nutr.**, v. ,n. ,p. 3431-3440. 2004.

CUTLER, L. S. et al. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol.**, v. 382, p. 301-11.1979.

DAVIDSON, M. B. **Diabetes mellitus**: diagnóstico e tratamento. 4ª ed. Rio de Janeiro, Revinter. 2001.

DELFINO, V. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J.Bras.Nefrol.**, v. 24, n. 1, p. 31-6. 2002.

DIABETES AND PERIODONTAL DISEASES. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. **J Priodontol**, v. 71, p. 664-78. 2000.

DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**.,v. 28, Suppl 1 S37-42. 2005.

DOINE, A. I. **Glândula submandibular do camundongo castrado. Estudo ultra-estrutural morfológico e citoquímico da fosfatase ácida**. São Paulo, Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade São Paulo). 1987.

FAVA-DE-MORAES, F.; ZANGHERI, E. O.; DOINE, A. I. Immunohistochemical localization of erythropoietin in the rat mouse submandibular gland. **Histochem. J.**, v. 11, p. 97-102. 1979.

FERGUSON, M. M. Salivary gland dysfunction. In: NORMAN, J. E.; de McGURK, M. **Color atlas and text of the salivary glands**: diseases, disorders and surgery. London, Mosby-Wolfe, Cap. 2, p. 49-57. 1995.

FERNANDES, A. A. H. et al. Effect of Naringerin on Biochemical Parameters in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 51-9, jan/feb. 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, 61-8. 1997.

FERREIRA, A. T. et al. Análise estereológica da glândula submandibular de ratos com diabetes induzidos pela aloxana. In: 13º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2005, Ribeirão Preto, SP. **Anais do 13º SIICUSP** (Ficha n. 2784) 2005.

FISKE, J. Diabetes Mellitus and oral care. **Dent. Update.**, v. 31, p. 190-6. 2004.

FOX, P. C. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. **J Am Dent Assoc.**, v. 110, p. 519-25. 1985.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulina, Glucacon e Diabete Melito. In:_____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.2002. p. 831-838.

GREGHI, S. L. A. et al. Relação entre diabetes mellitus e doença periodontal. **Ver. Ass Paul Cir Dent.**, v. 56, p. 265-69. 2002.

GROSS, J. L. et al. Diabetes melito: classificação e avaliação do controle glicêmico. **Revista Brasileira de Endocrinologia**, v. 9, p. 654. 2002.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **J. of Ethnopharmacology.**, v. 73, n.3, p. 461-70. 2000.

HAND, A. R.; WEISS, R. E. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. **Lab Invest.**, v. 51, n. 4, p. 429-39. 1984.

HIGH, A. S.; SUTTON, J.; HOPPER, A. H. A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Archs oral Biol.**, v. 30, n. 9, p. 667-71. 1985.

HUO, Y.; WINTERS, W. D.; YAO, DA-LIN. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 48-55. 2003.

IWASE, M. et al. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. **Hypertensive Research Clinical**, v. 21(1), p. 1-6. 1998.

JACOBY, F.; LEESON, C. R. The post-natal development of the rat submaxillary gland. **J. Anat.**, v. 93, p. 201-20. 1959.

JAHN, C. Diabetes and periodontal health. **Dent. Assist.**, v. 73, p. 24-7. 2004.

JIANG, Z. Y.; WOOLLAND, A. C.; WOLF, S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. **FEBS Lett.**, v. 268, n. 1, p. 69-71. 1990.

JOHNSON, D. A. et al. Regulation of salivary proteins. **J Dent Res.**, v. 66, p. 576-82. 1987.

JUNOD, A. et. al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, v. 48, p. 2129-39. 1969.

JUNQUEIRA, L. C. et al. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorfismo of mice submaxillary glands. **J. cell. comp. Physiol.**, v. 34, p. 129-58. 1949.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Glândulas anexas do tubo digestivo. In:_____. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.1999. p. 270-286.

KAKKAR, R. et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry.**, v. 151, p. 113-19. 1995.

KAMTCHOUING, P. et al. Protetive role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 62 p. 95-9. 1998.

KENNEDY, A. L.; LYONS, T. J. Glycation, oixitadation and lipoxidation in the development of diabetic complications. **Metabolism.**, v. 46, (12 Suppl 1), p. 14-21.1997.

KIM, S. K. et. al. Effects of diabetes and insulin on alpha-amylase messenger RNA levels in rat parotid glands. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 8, p. 1500-4. 1990.

KIRK, A. E. et al. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57B116 mice but not LDL receptor-deficient mice. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 4, p. 958-9. 1998.

KOIKE, K.; MIYOSHI, H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. **Hepatology Research**, 34, 65-73. 2006.

LALLA, E. et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1117-24. 2000.

LEE, S. K. et al. Defective glicose-stimulated insulin release from perfused islets of C57BL/6J mice. **Pancreas**, v. 11(2), p. 206-11. 1995.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132-42. 2003.

LEVI-MONTALCINI, R. & BOOKER, B. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. **Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)**, v. 46, p. 373-91. 1960.

LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21. 2004.

LIMAYE, P. V.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 243, n. 1-2, p. 147-52. 2004.

LIU, F. T.; LIN, H. S. Relationships between insulin and growth hormone in growth and development of rat submandibular gland. **proc Soc Exp Biol Med**, 13:1175-6. 1969a.

LIU, F. T.; LIN, H. S. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine gland in rat. **J Dent Res**, 48(4):559-67. 1969b.

LOPES, L. M. V. et al. Diagnóstico e Tratamento da Nefropatia Diabética. In: Vilar, L, Castellar E, Moura E, Leal E, Machado AC, Teixeira L, Campos R. **Endocrinologia clínica**. 2ed. Rio de Janeiro: Medsi; p. 625-36. 2001.

LUNA, L. G. **Manual of the histologic stainig methods of armed forces institute of pathology**. 3ª ed. New York; MacGraw Hill. 1968.

LUO, J. et. al. Nongenetic mouse models of non-insuline-dependent diabetes mellitus. **Metabolism, Clinical and Experimental**, v. 47(6), p. 663-68.1998.

MAHAY, S. et al. Streptozotocin-indecxed type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. **Mol Cell Biochem**, v. 261, n. 1-2, p. 175-81. 2004.

MANDEL, I. D. The functions of saliva. **J Dent Res**, v. 66, p. 623-7. 1987.

MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. da S. Chá verde: benefícios para a saúde humana. **Rev.Infarma**, Rio Grande do Sul, v. 16, n. 9-10, p. 68-70. 2004.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Review. Phytomedicine**, v. 2, p. 137-189. 1995.

MARQUES, S. F. G. **Nefropatia diabética experimental. Associação do estresse oxidativo com as lesões renais crônicas observadas em ratos diabéticos aloxânicos. Estudo clínico, laboratorial, anatomopatológico e dos marcadores bioquímicos envolvidos nos mecanismos de injúria celular mediada pelas espécies reativas do oxigênio (ERO)**. 2005. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2005.

MARTHA, R. C. D. et. al. Atividade hipoglicêmica de *Averrhoa carambola* L. usada em Manaus como antidiabético. **NewsLab.**, v. 38, p.142-148. 2000.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciênc.Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 401-07, abr/jun. 2006.

MEALEY, B. L. Impact of advances in diabetes care on dental treatment of the diabetic patient. **Compend Contin Educ Dent.**, v. 19, p. 41-4, 46-8, 50 passim; quiz 60. 1998.

MEALEY, B. L.; OATES, T. W. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **J Periodontol.**, v. 77, p. 1289-303. 2006.

MONTENEGRO, R. M. J. et. al. Evolução Materno-fetal de gestantes diabéticas seguidas no HC-FMRP-USP no período 1992-1999. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.**, v. 45, n. 5, out. 2001.

MORDES, J. P.; ROSSINI, A. A. Animal models of diabetes mellitus. **Philadelphia: Lea & Febiger**. 1985.

MORRIS, P. A. et al. Lipid analysis of the major salivary glands in streptozotocin-diabetic rats and the effects of insulin treatment. **Arch Oral Biol.**, v. 37, p. 489-94. 1992.

MUIR, A.; SCHATZ, D. A.; MACLAREN, N. K. **The patogenesis, predection and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus**. Edocrinology and Metabolism Clinics of North America, v. 21, n. 2, p. 199-219. 1992.

NATHAN, D. M. Initial Management of glycemia in type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v. 347, p. 1342-9. 2002.

NATIONAL DIABETES DATA GROUP. **Diabetes in America**: diabetes data compiled 1984. United States, U.S. Department of Health and Human Services, /NIH Publication N. 85-1468. 1985.

NEDERFORS, T. Xerostomia and hyposalivation. **Adv Dent Res.**, v. 14, p. 48-56. 2000.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e principios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. de Ciênc. Farmacêuticas.**, v. 41, n. 2, abr/jun. 2005.

NICOLAU J. et al Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. **J Oral Sci.**, v. 47, n. 2, p. 111-6. 2005

NOGUEIRA, F. N. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glandulas salivares de ratos diabéticos**. 2004 f.72 Tese. (Doutorado)-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

NOGUEIRA, N. et al. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, p. 133-9. 2005.

NOORAFSHAN, A. Volume-weighted mean volume of the the submandibular gland acini in male and female diabetic rats. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 613-6. 2006.

NOTKINS, A. L. The causes of diabetes. **Sci Am**, 241 (5): 62-73. 1979.

OKAUCHI, N. et al. Effects of obesity and inheritance on the development of non-insulin-dependent diabetes mellitas in Otsuka Long Evans Tokushima fatty rats. **Diabetic Research Clinical Practice**, v. 29(1), p. 1-10. 1995.

OPARA, E. C. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and effect of antioxidant supplementation on glycemia control. **J. Investig. Med.**, v. 52, n. 1, p. 19-23. 2004.

OZUARI, A. et. al. The effects of glyburide and insuline on the cardiac performande in rats with non-insulinedependent diabetes mellitus. **General Pharmacology**. v. 24(1), p. 165-69. 1993.

PEREZ, R. et. al. Vestibular end-organ impairment in an animal model of type 2 diabetes mellitus. **Laryngoscope**, v. 111(1), p.110-13. 2001.

PETRY, C. J. et al. Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. **Hormonal Metabolism Research**, v. 32(6), p. 233-39. 2000.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, 11, 1163-82. 2004.

PONTES, F. S. C. et al. Diabetes mellitus and Periodontal disease. **Rev Int. Periodontia Cli.**, v. 1, p. 37-39. 2004.

REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**, v. 25, p. S5-S20, Supplement. 2002.

REUTERVING, C. O. Pilocarpine-stimulated salivary flow rate and salivary glucose concentration in alloxan diabetic rats: influence of severity and duration of diabetes. **Acta Physiol Scand.**, v. 126, p. 511-5. 1986.

REUTERVING, C. O. et al. Salivary glands in long-term alloxan-diabetic rats: a quantitative light and electron-microscopic study. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.**, v. 95, p. 131-6. 1987.

SABU, M. C.; SMITHA, K.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 109-16. 2002.

SAID, O. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 251-265. 2002.

SALVI, G. E. et al. Experimental gingivitis in type 1 diabetics: a controlled clinical and microbiological study. **J. Clin Periodontol.**, v. 32, p. 310-6. 2005.

SCHELLINI, S. A. et al. O rato como modelo experimental do diabetes - estudo clínico-laboratorial. **Revista de Ciências Biomédicas**, São Paulo, v. 16, p. 25-36. 1995.

SCHMITZ, W. et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Rev. Ciências Biológicas da Saúde**, Londrina, v. 26., n. 2, p. 119-130. 2005.

SILVA, M. C. **Análise histológica e radiológica das alterações periodontais provocadas pela indução do diabetes em ratos.** 2007.144f. Dissertação. (Mestrado)—Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2007.

SIMMONS, R.; TEMPLETON, L. J.; GERTZ, S. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 Diabetes in the rat. **Diabetes**, v. 50, p. 2279-86. 2001.

SIMON, O. R.; WEST, M. E. Unstable diabetic state produced by small dose of streptozotocin in rats. **W. I. Med. J.**, v. 46, p. 146-9. 1992.

SINGH, S. N. et al. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in strptozotocin induced diabetic rats. **J. of Ethnopharmacology.**, v. 76, p. 269-77. 2001.

SINGH, J. et al. Beneficial effects and mechanism of action of *Momordica charantia* juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat. **Molecular and Cellular Biochemistry.**, p. 1-8. 2004.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 232-8. 2002.

SPADELLA, C. T. et al. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 46-54. 2005.

STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES. **Diabetes Care**, v. 28, Suppl 1 S4-S36. 2005.

SZCZEPANSKI, A.; MEDNIEKS, M. I.; HAND, A. R. Expression and distribution of parotid secretory protein in experimental diabetes. **Eur. J. Morphol.**, v. 36, p. 240-6. 1998.

TANAKA, T. Epidermal growth factor e rennin in mouse submandibular glands. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 1229-31. 1981.

THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Diabetes and periodontal diseases. **J Periodontol.**, v. 70, n.8, p. 935-49. Aug. 1999.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert commiteeon the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 9, p.1183. 1997.

TREVISANATO, S. I.; KIM, Y. I. Tea and Health. **Nutr. Rev.**, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2000.

TURNER, N. C.; WHITE, P. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 27(6), p. 884-90. 1996.

UGOCHUKWU, N. H.; COBOURNE, M. K. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. **Clin. Chim. Acta**, v. 336, n. 1, p. 73-81. 2003.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 266, 37-56. 2004.

VERNILLO, A. T. Diabetes mellitus: relevance to dental treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 91, p. 263-70. 2001.

VINSON, J. A.; ZHANG, J. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 9, p. 3710-3. 2005.

VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 4, p. 35-45. 2002.

WEIBEL, E. R. Stereological principles of morphometry in electron microscopic cytology Int. **Rev. Cytol**, v. 26, p. 235-302. 1969.

WEIMAR, V. L.; HARAGUCHI, K. H. A potent new mesodermal growth factor mouse submaxillary gland. A quantitative, comparative study with previously described submaxillary gland growth factor. **Physiol. Chem. Phys.**, v. 7, p. 7-21. 1975.

WHELTON, A.; WATSON, A. J.; ROCK, R. C. Metabólitos Nitrotenados e Função Renal. In: Burtis CA, Ashwood ER. **Fundamentos de química clínica**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 553-74. 1996.

WOHAIEB, S. A.; GODIN, D. V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. **Diabetes.**, v. 36, n. 9, p. 1014-8. 1987.

WU, L. Y. et al. Effect of Green Tea Supplementation on Insulin Sensitivity in Sprague-Dawley Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 643-48. 2004.

YADAV, S. et al. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 111-116. 2002.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative active of greea tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 12, p. 3549-52. 2002.

YUNG-HSI, K.; HIIPAKKA, R.; SHUTSUNG, L. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. **Endocrinology.**, v. 141, p. 980-987. 2000.

YUNG-HSI, K. et al. Tea, obesity, and diabetes. **Mol.Nutr.Food Res.**, v. 50, p. 188-210. 2006.

APÊNDICES

APÊNDICES

Encontram-se em apêndices os valores laboratoriais bioquímicos, ponderais, morfológicos e morfométricos dos animais controles (água/chá) e diabéticos (água/chá) durante os períodos experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias.

APÊNDICE A - Médias do “pool” peroxidação da glândula (nmol/gTecido) dos animais dos grupos controles e experimentais de 60 e 90 dias

	60 dias	90 dias
Controle Água	2,88	2,88
Controle Chá	2,77	2,5
Diabético Água	3,36	3,46
Diabético Chá	2,21	2,3

APÊNDICE B - Médias e desvio padrão (DP) da massa corporal (g) dos animais dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	347,2 $\pm$ 10,11	320,8 $\pm$ 9,91	366,8 $\pm$ 22,07	445,2 $\pm$ 44,4
Controle Chá	323,2 $\pm$ 32,44	335,2 $\pm$ 11,84	375,6 $\pm$ 19,36	385,4 $\pm$ 37,29
Diabético Água	227,2 $\pm$ 37,28	198,4 $\pm$ 17,92	185,2 $\pm$ 15,26	224,4 $\pm$ 12,72
Diabético Chá	260 $\pm$ 30,60	176,8 $\pm$ 28,58	192,8 $\pm$ 18,79	269,8 $\pm$ 68,77

APÊNDICE C - Médias e desvio padrão (DP) da Água / Chá ingeridos (mL/24h) pelos animais dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	10,78 $\pm$ 6,67	8,8 $\pm$ 4,45	40,2 $\pm$ 11,60	5,8 $\pm$ 4,58
Controle Chá	13 $\pm$ 7,48	18,8 $\pm$ 8,82	22 $\pm$ 16,91	18,2 $\pm$ 9,24
Diabético Água	140 $\pm$ 21,91	102 $\pm$ 51,54	109,2 $\pm$ 52,45	56 $\pm$ 44,99
Diabético Chá	102,6 $\pm$ 74,55	190 $\pm$ 8,94	77,6 $\pm$ 53,66	110 $\pm$ 82,22

APÊNDICE D - Médias e desvio padrão (DP) da glicemia (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	135,2 $\pm$ 20,56	123 $\pm$ 12,10	135,8 $\pm$ 20,47	128,2 $\pm$ 11,01
Controle Chá	139,4 $\pm$ 12,94	140 $\pm$ 24,37	139 $\pm$ 15,26	150,8 $\pm$ 14,55
Diabético Água	369,4 $\pm$ 131,98	382,2 $\pm$ 144,90	367 $\pm$ 29,36	385,6 $\pm$ 20,88
Diabético Chá	195 $\pm$ 90,63	521 $\pm$ 102,71	380,6 $\pm$ 80,94	339,4 $\pm$ 162,62

APÊNDICE E - Médias e desvio padrão (DP) dos exames laboratoriais (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais de 15 dias

	Uréia	Albumina	Creatinina	Proteínas totais	Colesterol	Triglicérides
Controle Água	26,4 $\pm$ 3,19	3,21 $\pm$ 0,13	0,514 $\pm$ 0,02	7,08 $\pm$ 0,10	66,8 $\pm$ 4,70	88 $\pm$ 16,05
Controle Chá	24,4 $\pm$ 1,37	3,054 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,04	7,014 $\pm$ 0,10	63,4 $\pm$ 9,16	122 $\pm$ 61,19
Diabético Água	58,8 $\pm$ 20,26	2,704 $\pm$ 0,19	0,432 $\pm$ 0,03	6,298 $\pm$ 0,37	80,8 $\pm$ 10,99	206 $\pm$ 98,60
Diabético Chá	61,6 $\pm$ 15,30	2,936 $\pm$ 0,13	0,53 $\pm$ 0,04	6,78 $\pm$ 0,36	81,4 $\pm$ 8,38	94,8 $\pm$ 52,99

APÊNDICE F - Médias e desvio padrão (DP) dos exames laboratoriais (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais de 30 dias

	Uréia	Albumina	Creatinina	Proteínas totais	Colesterol	Triglicérides
Controle Água	32,8 $\pm$ 1,46	3,056 $\pm$ 0,12	0,452 $\pm$ 0,04	6,85 $\pm$ 0,25	80 $\pm$ 7,19	83,6 $\pm$ 24,78
Controle Chá	38,4 $\pm$ 5,15	3 $\pm$ 0,03	0,444 $\pm$ 0,03	6,856 $\pm$ 0,16	78,6 $\pm$ 7,41	99 $\pm$ 22,94
Diabético Água	98,6 $\pm$ 6,97	2,83 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,04	6,054 $\pm$ 0,28	74 $\pm$ 9,87	158,4 $\pm$ 72,92
Diabético Chá	114,6 $\pm$ 33,72	2,66 $\pm$ 0,10	0,708 $\pm$ 0,15	5,774 $\pm$ 0,19	64,8 $\pm$ 13,09	65,2 $\pm$ 43,80

APÊNDICE G - Médias e desvio padrão (DP) dos exames laboratoriais (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais de 60 dias

	Uréia	Albumina	Creatinina	Proteínas totais	Colesterol	Triglicérides
Controle Água	35 $\pm$ 5,72	2,976 $\pm$ 0,07	0,468 $\pm$ 0,04	7,038 $\pm$ 0,23	72,8 $\pm$ 10,51	56 $\pm$ 13,30
Controle Chá	41,2 $\pm$ 4,63	3,088 $\pm$ 0,09	0,544 $\pm$ 0,02	6,96 $\pm$ 0,15	87,2 $\pm$ 6,67	98,2 $\pm$ 22,79
Diabético Água	101,2 $\pm$ 12,03	2,554 $\pm$ 0,21	0,462 $\pm$ 0,04	6,542 $\pm$ 0,21	75,4 $\pm$ 5,85	104,4 $\pm$ 37,41
Diabético Chá	100,2 $\pm$ 12,32	2,734 $\pm$ 0,27	0,444 $\pm$ 0,12	6,346 $\pm$ 0,35	78,6 $\pm$ 10,04	110,2 $\pm$ 41,95

APÊNDICE H - Médias e desvio padrão (DP) dos exames laboratoriais (mg/dL) dos animais dos grupos controles e experimentais de 90 dias

	Uréia	Albumina	Creatinina	Proteínas totais	Colesterol	Triglicérides
Controle Água	30,8 $\pm$ 3,34	3,09 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,01	7 $\pm$ 0,17	104,4 $\pm$ 6,10	60,4 $\pm$ 8,36
Controle Chá	34,4 $\pm$ 5,37	2,962 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,03	6,632 $\pm$ 0,12	91,6 $\pm$ 6,97	64 $\pm$ 11,11
Diabético Água	109,8 $\pm$ 11,80	2,586 $\pm$ 0,13	0,54 $\pm$ 0,04	6,782 $\pm$ 0,25	89,4 $\pm$ 9,05	84 $\pm$ 29,54
Diabético Chá	84 $\pm$ 39,55	2,612 $\pm$ 0,12	0,532 $\pm$ 0,09	6,234 $\pm$ 0,17	83 $\pm$ 14,79	120,4 $\pm$ 61,80

APÊNDICE I - Médio e desvio padrão (DP) da Massa Glandular Submandibular (g) dos animais dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	0,38 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,03
Controle Chá	0,39 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,03
Diabético Água	0,31 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,05
Diabético Chá	0,34 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,05

APÊNDICE J - Médias e desvio padrão (DP) da Densidade de volume (%) dos grupos controles e experimentais de 15 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	60,632 $\pm$ 3,75	21,18 $\pm$ 2,34	1,368 $\pm$ 0,07	3,02 $\pm$ 1,25	3,6 $\pm$ 0,70	8,532 $\pm$ 2,08
Controle Chá	59,232 $\pm$ 3,93	26,64 $\pm$ 3,67	1,5 $\pm$ 0,30	1,852 $\pm$ 0,43	1,86 $\pm$ 0,60	7,416 $\pm$ 0,95
Diabético Água	62,168 $\pm$ 3,62	21,904 $\pm$ 2,14	1,756 $\pm$ 0,23	1,912 $\pm$ 0,80	2,7 $\pm$ 1,00	7,664 $\pm$ 1,06
Diabético Chá	67,224 $\pm$ 2,82	19,212 $\pm$ 3,65	1,436 $\pm$ 0,29	1,492 $\pm$ 0,57	1,66 $\pm$ 0,45	7,132 $\pm$ 0,92

APÊNDICE K - Médias e desvio padrão (DP) da Densidade de Volume (%) dos grupos controles e experimentais de 30 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	60,03 $\pm$ 2,51	25,90 $\pm$ 1,34	2,35 $\pm$ 0,39	2,97 $\pm$ 0,38	2,18 $\pm$ 0,13	6,05 $\pm$ 1,35
Controle Chá	56,33 $\pm$ 2,61	29,69 $\pm$ 2,60	2,74 $\pm$ 0,25	1,84 $\pm$ 0,40	2,07 $\pm$ 0,34	6,17 $\pm$ 0,97
Diabético Água	67,98 $\pm$ 3,96	19,68 $\pm$ 2,93	3,43 $\pm$ 0,58	1,35 $\pm$ 0,27	2,24 $\pm$ 0,18	4,64 $\pm$ 1,12
Diabético Chá	71,23 $\pm$ 2,94	15,23 $\pm$ 1,56	2,74 $\pm$ 0,69	1,72 $\pm$ 0,52	2,34 $\pm$ 0,24	5,76 $\pm$ 1,61

APÊNDICE L - Médias e desvio padrão (DP) da Densidade de Volume (%) dos grupos controles e experimentais de 60 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	50,34 $\pm$ 1,01	36,88 $\pm$ 0,58	3,08 $\pm$ 0,60	0,77 $\pm$ 0,18	2,56 $\pm$ 0,39	5,72 $\pm$ 0,72
Controle Chá	56,34 $\pm$ 1,75	30,52 $\pm$ 1,88	2,92 $\pm$ 0,45	0,96 $\pm$ 0,53	2,24 $\pm$ 0,72	6,42 $\pm$ 0,98
Diabético Água	70,09 $\pm$ 1,21	17,35 $\pm$ 2,23	3,14 $\pm$ 0,59	0,89 $\pm$ 1,23	2,33 $\pm$ 0,16	5,54 $\pm$ 1,05
Diabético Chá	72,06 $\pm$ 2,10	16,52 $\pm$ 2,07	3,10 $\pm$ 0,77	1,07 $\pm$ 0,34	2,32 $\pm$ 0,27	3,86 $\pm$ 1,27

APÊNDICE M - Médias e desvio padrão (DP) da Densidade de volume (%) dos grupos controles e experimentais de 90 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	47,69 $\pm$ 4,28	41,69 $\pm$ 2,95	2,58 $\pm$ 0,60	0,83 $\pm$ 0,15	2,52 $\pm$ 0,92	4,68 $\pm$ 0,95
Controle Chá	49,10 $\pm$ 2,38	49,10 $\pm$ 1,49	2,47 $\pm$ 0,60	0,96 $\pm$ 0,15	2,37 $\pm$ 0,26	5,78 $\pm$ 0,86
Diabético Água	73,31 $\pm$ 1,59	17,96 $\pm$ 1,84	2,40 $\pm$ 0,27	0,82 $\pm$ 0,17	2,20 $\pm$ 0,18	3,05 $\pm$ 0,19
Diabético Chá	74,25 $\pm$ 1,55	17,15 $\pm$ 2,43	2,04 $\pm$ 0,82	0,76 $\pm$ 0,19	2,25 $\pm$ 0,16	3,13 $\pm$ 0,35

APÊNDICE N - Médias e desvio padrão (DP) do Volume total (mm³) dos grupos controles e experimentais de 15 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	173,64 $\pm$ 8,44	60,61 $\pm$ 5,69	3,93 $\pm$ 0,35	8,98 $\pm$ 4,55	10,31 $\pm$ 1,92	24,96 $\pm$ 7,73
Controle Chá	130,33 $\pm$ 23,46	74,62 $\pm$ 8,94	3,77 $\pm$ 0,99	2,98 $\pm$ 1,12	5,86 $\pm$ 1,80	13,97 $\pm$ 4,06
Diabético Água	143,82 $\pm$ 29,03	51,01 $\pm$ 13,24	4,14 $\pm$ 1,32	4,10 $\pm$ 1,30	6,32 $\pm$ 2,78	17,24 $\pm$ 1,57
Diabético Chá	173,02 $\pm$ 16,94	49,84 $\pm$ 12,11	3,63 $\pm$ 0,55	3,78 $\pm$ 1,44	4,30 $\pm$ 1,27	18,26 $\pm$ 2,37

APÊNDICE O - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Total (mm³) dos grupos controles e experimentais de 30 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	182,70 $\pm$ 18,41	78,98 $\pm$ 9,54	7,15 $\pm$ 1,22	9,01 $\pm$ 1,14	6,64 $\pm$ 0,72	18,09 $\pm$ 3,08
Controle Chá	151,92 $\pm$ 33,21	78,45 $\pm$ 9,67	7,29 $\pm$ 1,27	4,86 $\pm$ 1,18	5,41 $\pm$ 0,85	16,80 $\pm$ 4,76
Diabético Água	148,17 $\pm$ 20,71	42,21 $\pm$ 4,97	7,31 $\pm$ 0,74	2,92 $\pm$ 0,57	4,83 $\pm$ 0,30	9,88 $\pm$ 1,85
Diabético Chá	138,45 $\pm$ 22,29	29,30 $\pm$ 4,21	5,18 $\pm$ 1,08	3,31 $\pm$ 1,13	4,54 $\pm$ 0,79	10,80 $\pm$ 2,66

APÊNDICE P - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Total (mm³) dos grupos controles e experimentais de 60 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	158,74 $\pm$ 13,80	116,63 $\pm$ 12,89	9,91 $\pm$ 2,46	2,41 $\pm$ 0,50	8,18 $\pm$ 1,74	18,22 $\pm$ 3,63
Controle Chá	172,59 $\pm$ 13,77	92,50 $\pm$ 2,65	9,04 $\pm$ 1,89	2,94 $\pm$ 1,68	5,68 $\pm$ 3,68	19,60 $\pm$ 3,49
Diabético Água	154,15 $\pm$ 17,52	36,51 $\pm$ 9,28	6,41 $\pm$ 0,99	1,88 $\pm$ 0,63	4,78 $\pm$ 0,31	11,19 $\pm$ 1,11
Diabético Chá	155,94 $\pm$ 15,71	34,52 $\pm$ 4,81	6,84 $\pm$ 1,73	2,38 $\pm$ 0,98	5,10 $\pm$ 1,12	8,75 $\pm$ 3,77

APÊNDICE Q - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Total (mm³) dos grupos controles e experimentais de 90 dias

	Ácino	Ducto Granuloso	Ducto Intercalar	Ducto Estriado	Ducto excretor	Estroma
Controle Água	155,75 $\pm$ 12,26	135,85 $\pm$ 15,86	8,63 $\pm$ 2,62	2,73 $\pm$ 0,59	8,17 $\pm$ 2,71	15,52 $\pm$ 3,97
Controle Chá	159,04 $\pm$ 10,98	125,86 $\pm$ 11,65	8,11 $\pm$ 2,39	3,14 $\pm$ 0,54	7,73 $\pm$ 1,22	18,99 $\pm$ 4,10
Diabético Água	193,37 $\pm$ 28,96	47,52 $\pm$ 9,52	6,33 $\pm$ 1,21	2,17 $\pm$ 0,52	5,82 $\pm$ 1,15	8,13 $\pm$ 1,63
Diabético Chá	218,18 $\pm$ 27,96	51,42 $\pm$ 13,36	5,71 $\pm$ 1,91	2,26 $\pm$ 0,71	6,61 $\pm$ 0,91	9,06 $\pm$ 0,54

APÊNDICE R - Médio e desvio padrão (DP) do Número de células ácino dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	436,38 $\pm$ 34,52	300,67 $\pm$ 52,75	288,83 $\pm$ 14,65	356,84 $\pm$ 47,4
Controle Chá	386,14 $\pm$ 60,47	248,11 $\pm$ 56,73	275,92 $\pm$ 38,80	361,07 $\pm$ 29,73
Diabético Água	277,67 $\pm$ 40,25	252,40 $\pm$ 25,23	283,54 $\pm$ 47,37	212,56 $\pm$ 38,08
Diabético Chá	304,33 $\pm$ 27,11	280,12 $\pm$ 41,17	217,06 $\pm$ 33,79	232,72 $\pm$ 32,08

APÊNDICE S - Médias e desvio padrão (DP) do Número de células Ducto Granuloso dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	151,39 $\pm$ 22,55	149,89 $\pm$ 22,72	176,2 $\pm$ 16,96	224,70 $\pm$ 23,80
Controle Chá	170,67 $\pm$ 29,96	150,12 $\pm$ 29,71	165,43 $\pm$ 9,56	196,36 $\pm$ 21,89
Diabético Água	111,61 $\pm$ 14,18	103,10 $\pm$ 12,97	93,20 $\pm$ 18,62	102,67 $\pm$ 23,35
Diabético Chá	111,99 $\pm$ 8,23	102,01 $\pm$ 13,54	81,88 $\pm$ 12,95	76,42 $\pm$ 14,19

APÊNDICE T - Médias e desvio padrão (DP) do Volume celular do ácino (μ^3) dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	2041,85 $\pm$ 209,43	2464,04 $\pm$ 243,73	2105,48 $\pm$ 171,98	2036,08 $\pm$ 267,05
Controle Chá	1895,18 $\pm$ 383,46	2488,88 $\pm$ 338,28	2205,62 $\pm$ 241,26	2294,34 $\pm$ 305,11
Diabético Água	2813,54 $\pm$ 367,05	2395,01 $\pm$ 413,78	2272 $\pm$ 317,74	4478,59 $\pm$ 595,38
Diabético Chá	3018,78 $\pm$ 554,69	2494,15 $\pm$ 219,01	2728,62 $\pm$ 438,38	4291,22 $\pm$ 796,39

APÊNDICE U - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Celular do Ducto Granuloso (μ^3) dos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	2560,99 $\pm$ 860,47	3316,09 $\pm$ 775,72	3510,76 $\pm$ 456,35	3425,31 $\pm$ 293,09
Control Chá	2120,07 $\pm$ 550,92	2903,35 $\pm$ 303,65	3485,58 $\pm$ 552,68	3614,55 $\pm$ 361,08
Diabético Água	2387,53 $\pm$ 296,07	2053 $\pm$ 169,25	1920,73 $\pm$ 272,96	3473,04 $\pm$ 877,82
Diabético Chá	2159,75 $\pm$ 411,82	2057,61 $\pm$ 245	2212,38 $\pm$ 478,25	3877,19 $\pm$ 615,86

APÊNDICE V - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Citoplasmático do Ácino (μ^3) dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	2041,8 $\pm$ 209,4	2404,16 $\pm$ 243,42	2044,21 $\pm$ 169,57	1980,12 $\pm$ 268,13
Controle Chá	1826,65 $\pm$ 383,05	2430,51 $\pm$ 338,79	2149,46 $\pm$ 241,91	2238,81 $\pm$ 303,83
Diabético Água	2813,5 $\pm$ 367,05	2339,41 $\pm$ 411,31	2216,67 $\pm$ 317,96	4420,52 $\pm$ 595,09
Diabético Chá	3018,8 $\pm$ 554,6	2434,27 $\pm$ 218,42	2672,83 $\pm$ 437,5	4230,35 $\pm$ 796,97

APÊNDICE W - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Citoplasmático do Ducto Granuloso (μ^3) dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	2442,77 $\pm$ 856,2	3176,19 $\pm$ 766,22	3368,72 $\pm$ 457,45	3287,98 $\pm$ 293,09
Controle Chá	2001,88 $\pm$ 535,61	2615,37 $\pm$ 485,24	3339,37 $\pm$ 548,99	3476,16 $\pm$ 361,08
Diabético Água	2257,52 $\pm$ 295,78	2062,12 $\pm$ 386,67	1800,84 $\pm$ 266,46	3342,02 $\pm$ 877,82
Diabético Chá	2045,03 $\pm$ 292,69	1977,94 $\pm$ 361	2080,12 $\pm$ 879,41	3741,12 $\pm$ 620,22

APÊNDICE X - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Nuclear do Ácino (μ^3) dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	73,72 $\pm$ 7,29	59,87 $\pm$ 3,39	61,26 $\pm$ 2,76	55,94 $\pm$ 1,64
Controle Chá	68,52 $\pm$ 5,81	58,36 $\pm$ 1,45	56,16 $\pm$ 4,01	55,52 $\pm$ 1,72
Diabético Água	59,61 $\pm$ 3,31	55,59 $\pm$ 2,64	55,32 $\pm$ 2,71	58,06 $\pm$ 0,89
Diabético Chá	69,66 $\pm$ 5,74	59,87 $\pm$ 1,97	55,78 $\pm$ 1,72	60,87 $\pm$ 1,17

APÊNDICE Y - Médias e desvio padrão (DP) do Volume Nuclear do Ducto Granuloso (μ^3) dos grupos controles e experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias

	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Controle Água	118,21 $\pm$ 6,34	139,89 $\pm$ 11,64	142,02 $\pm$ 3,93	137,32 $\pm$ 7,91
Controle Chá	118,16 $\pm$ 22,8	120,97 $\pm$ 18,3	146,2 $\pm$ 12	138,39 $\pm$ 8,44
Diabético Água	130 $\pm$ 7,78	116,18 $\pm$ 9,6	119,88 $\pm$ 7,36	131,01 $\pm$ 4,87
Diabético Chá	114,7 $\pm$ 11,1	135,28 $\pm$ 7,02	132,26 $\pm$ 11,85	136,06 $\pm$ 6,55

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Ofício de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. N° 10/2007

Bauru 19 de junho de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Efeito terapêutico do chá verde na morfologia e peroxidação lipídica das glândulas submandibulares de ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina”**, de autoria de Isabel Cristina Meneghetti, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* nesta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 010/2007

Bauru, 20 de abril de 2010.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa “Efeito terapêutico do chá verde na morfologia e peroxidação lipídica das glândulas submandibulares de ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina” de autoria de Isabel Cristina Meneghetti, para EFEITO TERAPÊUTICO DO CHÁ VERDE NA MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS COM DIABETES INDUZIDO PELA ESTREPTOZOTOCINA, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, considerando não terem sido feitas modificações na metodologia do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B - Laudo técnico e controle de qualidade – Chá verde (*Camellia sinensis*)

Santosflora
ERVAS, ESPECIARIAS E
EXTRATOS SECOS

Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
R Tuluti, 718/720 - CEP 03081-000
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 6191-8787 - Fax: +55 11 6191-6387

Controle de qualidade
Laudo Técnico e Identificativo

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
WebSite: www.santosflora.com.br

Ref N/ Pedido: 2007004950

Registro IBAMA: 35867
Licença de Funcionamento: -----
Autorização ANVISA: 1.04.604-1
Registro CRF: 2-02635-0101
Data: 17/7/2007

NOMENCLATURA: CHA VERDE IMPORTADO

<p>Nome científico(gênero/espécie): <i>Camellia sinensis</i></p> <p>Identificação botânica: <i>Camellia sinensis</i></p> <p>Parte utilizada: Folha</p> <p>Manufatura/Val(mês/ano): 05/2006 - 05/2009</p> <p>Método de secagem: Ao forno</p>	<p>Esterilização: Não Houve</p> <p>Família: Ternstroemiaceae</p> <p>Origem: China</p> <p>Lote: CHV106/02</p> <p>Granulometria:</p>
---	--

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Folhas alternas, ovado-agudas, quase lanceoladas, levemente denteadas, glabras, pouco coriáceas, curo-peciolas, de coloração verde ao verde escuro. Característica do pó: fino e higroscópico de coloração verde ao verde escuro, sabor e odor característicos.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 6,5% (*esp. máx. 12%); Cinzas Totais: 5,9% (*esp. máx. 8%); Cinzas insol ácido: 1,2% (*esp. máx. 5%).

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teor para Taninos: 11,0% (*esp. mín. 5%); Teor de polifenóis: 10,0% (especificação: informativo).
Teor de Cafeína: 3,52% (*esp. mín. 2%)

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 10.000 ufc/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufc/g ou ml	N.R.
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufc/g ou ml	N.R.
<i>E. coli</i>	Ausência	N.R.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	N.R.
<i>Pseudomonas sp</i>	Ausência	N.R.
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	N.R.

* LIMITES ESTABELECIDOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS (WHO/PHARM/98, BHP 1998).

* ARMAZENAR EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DE UMIDADE E CALOR.

* N.R. REFERE-SE A TESTE NÃO REALIZADO

* ALTERAÇÃO DE COR PODEM OCORRER DEVIDO SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL

* A VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS

*Especificação experimental interna.

Susana Salvador Cabral Gasparri
Farmacêutica Responsável:
CRF/SP: 35.739